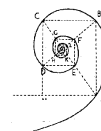




UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO



SCUOLA DI DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE

CICLO XXVI
Anno Accademico 2012/2013

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

MED04

**La Variante Associata alla Longevità (LAV) del gene
BPIFB4 modula eNOS e la funzionalità vascolare**

Dottorando: Chiara Carmela SPINELLI

Matricola N° R09212

TUTORE: Prof. Silvano BOSARI

CO-TUTORE: Dott. Annibale PUCA

DIRETTORE DEL DOTTORATO: Prof. Mario CLERICI

SOMMARIO

Introduzione. Il ritardo nel processo di invecchiamento osservato negli individui longevi (LLIs) è diventato, negli ultimi anni, oggetto di numerosi studi. Si pensa infatti che il loro genoma possa contenere una serie di polimorfismi (SNPs) in grado di influenzare il processo d'invecchiamento, un fenomeno associato ad un progressivo declino nella produzione di ossido nitrico (ON) e ad un'alterazione delle funzioni vascolari.

Dati preliminari hanno dimostrato che la mutazione rs2070325 nel gene *BPIFB4*, è arricchita nei soggetti longevi di tre popolazioni indipendenti. La variazione rs2070325 fa parte di un aplotipo costituito da quattro SNPs che può portare alla sintesi di una proteina wild-type-WT (66%; Ile229/Asn281/Leu488/Ile494-BPIFB4), una Longevity Associated Variant-LAV (29,5%; Val229/Thr281/Phe488/Thr494-BPIFB4) e una Rare Variant-RV (2%; Ile229/Asn281/Phe488/Thr494-BPIFB4).

In questo studio verrà esplorato il possibile ruolo della proteina *BPIFB4* e delle sue isoforme nella modulazione del tono vascolare. In particolare si utilizzerà un sistema ex vivo di arteria mesenterica di topo, un distretto vascolare coinvolto nella modulazione della pressione arteriosa.

Materiali e Metodi. L'espressione della proteina *BPIFB4* è stata analizzata ex vivo in arterie mesenteriche di topi C57BL6 incrementando la pressione di perfusione. La reattività vascolare è stata valutata nei vasi trasfettati con i plasmidi codificanti per *BPIFB4*-WT, -LAV o -RV, o con il plasmide vuoto usato come controllo negativo. Alcuni vasi sono stati trasfettati con il siRNA specifico per *BPIFB4* o con un controllo siRNA scrambled. Tutti i vasi sono stati perfusi a 100mmHg per 1h e poi a 60mmHg per 5h. La vasocostrizione viene indotta con KCl 80mM e con dosi crescenti di fenilefrina (da 10^{-9} M a 10^{-6} M) o U46619 (da 10^{-11} M a 10^{-6} M). La vasodilatazione, dipendente o indipendente dall'endotelio, è stata valutata di contro, misurando la risposta a dosi crescenti rispettivamente di acetilcolina (da 10^{-9} M a 10^{-5} M) e nitroglicerina (da 10^{-9} M a 10^{-5} M) dei vasi pre-contratti con una dose di U46619 tale da avere un livello di contrazione uguale per ogni esperimento. La vasodilatazione indotta da acetilcolina è stata testata anche in presenza di L-NAME (300μM) o di Gö6976 (1μM), un inibitore di PKCα. Alcuni esperimenti sono stati effettuati su vasi prelevati da topi knockout in eterozigosi per *Mthfr* trasfettati con *BPIFB4*-LAV e dai relativi controlli.

Tramite western blotting e l'utilizzo di anticorpi specifici è stata verificata la presenza nei lisati totali del pool dei vasi trattati delle proteine: *BPIFB4*, eNOS, p-eNOS^{S1177}, PKCα, p-PKC-α^{T497}, SIRT-1, p-SIRT1^{S47}, β-actin.

Risultati e conclusioni. Abbiamo verificato che l'espressione di *BPIFB4* aumenta, nelle pareti delle arterie mesenteriche murine in seguito ad uno stress biomeccanico, come l'aumento della pressione all'interno del vaso. Inoltre la sua inibizione, tramite siRNA, causa un danno rilevante alle funzioni vascolari.

L'overespressione di *BPIFB4*-WT nel vaso non ha alcun effetto sulle funzioni vascolari, al contrario di *BPIFB4*-LAV che è in grado di incrementare la vasodilatazione indotta dall'acetilcolina e di promuovere la fosforilazione di eNOS (endothelial nitric oxide synthase) sulla serina1177 (un sito di attivazione dell'enzima). Trattando i vasi che esprimono *BPIFB4*-LAV, con l'inibitore di eNOS

L-NAME, si osserva una riduzione della vasodilatazione (dopo somministrazione di acetilcolina) più pronunciata di quella che si ha nei vasi utilizzati come controllo, indicando una maggiore presenza di ON. In questi vasi è stata anche verificata una maggiore presenza di PKC α fosforilata sul suo sito di attivazione (treonina 497) e, come ci si aspettava, la somministrazione dell'inibitore di PKC α , Gö6976, abolisce la capacità di BPIFB4-LAV di aumentare sia la risposta vasodilatatoria che la fosforilazione di eNOS. Questi risultati dimostrano che BPIFB4-LAV è in grado di agire sul signaling di PKC α potenziando così la vasodilatazione mediata dall'endotelio.

In fine, abbiamo dimostrato la capacità di BPIFB4-LAV di ripristinare una normale capacità vasodilatatoria in arterie mesenteriche di topo knockout in eterozigosi per l'enzima Metilentetraidrofolato reduttasi.

Per quanto concerne l'isoforma BPIFB4-VT, essa ha un effetto deleterio sul vaso paragonabile a quello indotto dal trattamento con il siRNA. In particolare, i vasi trasfettati con BPIFB4-RV presentano gravi disfunzioni endoteliali associate ad una riduzione della fosforilazione di eNOS e PKC α . Inoltre, mentre BPIFB4-LAV causa solo una parziale riduzione della vasocostrizione indotta da fenilefrina e da potassio, BPIFB4-RV sembra abolirla quasi del tutto. Nessuna delle due isoforme ha però influenza sulla contrazione indotta da U46619 (un mimetico dei trombossani che necessita di un relativamente basso incremento di Ca²⁺ per poter agire), suggerendone un coinvolgimento nella modulazione del rilascio di Ca²⁺.

In conclusione, questi dati hanno evidenziato per la prima volta la presenza della proteina BPIFB4 a livello vascolare ed il suo ruolo nel mantenimento del tono vascolare.

Abbiamo inoltre dimostrato la capacità della variante di BPIFB4 associata alla longevità, BPIFB4-LAV di indurre un miglioramento della reattività vascolare contrapponendosi alle variazioni dell'età; agendo sull'attivazione di PKC α e di eNOS.

Queste scoperte possono essere utilizzate per trattare terapeuticamente le disfunzioni a carico di eNOS che si presentano durante il processo di invecchiamento, dimostrando in ultimo come l'individuo longevo possa rappresentare un buon modello per studiare le patologie correlate all'avanzare dell'età.

ABSTRACT

Background and aim: The delay in aging observed in long-lived individuals (LLIs) runs in families and has become the object of intense investigation. LLIs are thought to be enriched/depleted in single-nucleotide polymorphisms (SNPs) that influence aging, a phenomenon associated with progressive decline in nitric oxide (NO) production and impairment of endothelial function.

Preliminary data have shown that the variation rs2070325 (Ile229Val) of the bactericidal/permeability-increasing fold-containing family B member 4 (BPIFB4) is highly enriched in three independent LLIs populations. Rs2070325 is part of a four-SNPs haplotype that codifies for a wild type-WT (66%; Ile229/Asn281/Leu488/Ile494-BPIFB4), a Longevity Associated Variant-LAV (29,5%; Val229/Thr281/Phe488/Thr494-BPIFB4) and a Rare Variant-RV (2%; Ile229/Asn281/Phe488/Thr494-BPIFB4).

We decided to explore the role of BPIFB4 and the effect of isoform in the modulation of vascular tone using mice mesenteric vessels, a vascular district involved in blood pressure homeostasis.

Materials and Methods: The presence of the BPIFB4 protein was tested ex vivo in mesenteric arterial from C57BL6 mice perfused with increasing pressure levels. Vascular reactivity was tested in vessels transfected with the vector encoding WT-, LAV- or RV-BPIFB4, or with empty plasmid for use as a negative control. Some vessels were transfected with a BPIFB4 siRNA or a scrambled, control siRNA. All vessels were perfused at 100 mmHg for 1 hour and then at 60 mmHg for 5 hours. Vasoconstriction was assessed with 80 mM KCl or with increasing doses of phenylephrine (from 10^{-9} M to 10^{-6} M) or U46619, a thromboxane agonist that elicit contractions relying relative small Ca^{2+} increase (from 10^{-11} M to 10^{-6} M). Endothelium-dependent and -independent relaxations were assessed by measuring the dilatory responses of mesenteric arteries to cumulative concentrations of acetylcholine (from 10^{-9} M to 10^{-5} M) or nitroglycerine (from 10^{-9} M to 10^{-5} M), respectively, in vessels pre-contracted with U46619 at a dose necessary to obtain a similar level of pre-contraction in each ring.

Acetylcholine vasorelaxation was also tested in the presence of L-NAME (300 μ M) an eNOS inhibitor, or Gö6976 (1 μ M), a PKC- α inhibitor, and on mesenteric vessels from heterozygotic Mthfr knockout mice transfected with LAV-BPIFB4 or empty plasmid.

Western blotting was performed on protein extracts from pooling of transfected, perfused vessels. The presence of BPIFB4, eNOS, p-eNOS^{S1177}, PKC α , p-PKC α , SIRT-1, p-SIRT1^{S47}, β -actin proteins were detected with specific antibody.

Results and conclusions: We found that the biomechanical stress following the increase in pressure within the vasculature enhances the native BPIFB4 protein expression. Additionally, BPIFB4 inhibition by siRNA exerted a harmful effect on vascular function by inducing endothelial dysfunction.

While the WT-BPIFB4 overexpression had no effect on vascular function, LAV-BPIFB4 enhanced the acetylcholine mediated vasorelaxation and promoted phosphorylation of eNOS on serine 1177 (an activation site of the enzyme). Furthermore, the inhibition of nitric oxide by L-NAME in LAV-BPIFB4 transfected

vessels evoked a more pronounced effect on acetylcholine vasorelaxation as compared to empty plasmid treated vessels, indicating higher presence of NO in the former.

We found that PKC α was more phosphorylated at threonine 497 (an activation site of the enzyme) in LAV-BPIFB4-expressing vessels and treatment with the PKC- α inhibitor Gö6976 significantly inhibited the acetylcholine-induced vasorelaxation in control vessels, and abolished the enhanced endothelial vasorelaxation and eNOS phosphorylation of LAV-BPIFB4-expressing vessels. These results indicate that LAV-BPIFB4 activates PKC α signalling, enhancing endothelial vasorelaxation.

Finally, we showed that in dysfunctional vessels from experimental models (*Mthfr*^{+/-} mice,) LAV-BPIFB4 restored endothelial nitric oxide vasorelaxation.

We also analyzed RV-BPIFB4 isoform, which showed to exert a deleterious effect on endothelial function comparable to that observed during the inhibition of BPIFB4 by siRNA. In particular, in vessels transfected with RV-BPIFB4 we detected strong endothelial dysfunction associated with an impairment of PKC α and eNOS phosphorylation. While LAV-BPIFB4 evoked a mild reduction of phenylephrine and potassium vascular responses, these appeared almost abolished after RV-BPIFB4 transfection. The transfection with RV- and LAV-BPIFB4 did not influence the vascular response to U46619, thus suggesting a possible effect of the two isoform on the modulation of Ca²⁺ release.

In conclusion, this research has highlighted for the first time the presence of BPIFB4 in the vascular district and its involvement in the modulation of vascular tone.

We have also demonstrated the ability of the Longevity Associated Variant of BPIFB4, LAV-BPIFB4, to induce an improvement in vascular reactivity in opposition to changes in age, acting on the activation of PKC α and eNOS.

Thus, LAV-BPIFB4 may provide a potential tool for innovative therapeutic strategies aimed at fighting endothelial dysfunction and eNOS deficiency-related diseases of aging.

INDICE

SOMMARIO

ABSTRACT

INDICE

LISTA SIMBOLI.....	1
INTRODUZIONE.....	3
1 La longevità.....	3
1.1 Diffusione del fenotipo longevo.....	3
1.2 Le popolazioni di ultracentenari.....	5
1.3 Complessità del fenotipo longevo: ereditarietà ed ambiente.....	6
1.4 Contributo del corredo genetico alla longevità.....	9
1.5 Pathways coinvolti nel processo di invecchiamento.....	12
2 Ossido nitrico e ossido nitrico sintasi (NOS).....	17
2.1 eNOS.....	18
2.2 Meccanismi di attivazione di eNOS.....	20
3 eNOS, l'invecchiamento vascolare e la longevità.....	23
3.1 La vasodilatazione indotta dall'endotelio.....	23
3.2 L'invecchiamento vascolare.....	24
3.3 ON, eNOS e longevità.....	24
4 BPIFB4.....	28
MATERIALI E METODI.....	32
1 Costrutti.....	32
2 Western blotting.....	32
3 Trasfezione ex vivo dei vasi murini e valutazione della reattività vascolare.....	33
RISULTATI.....	35
DISCUSSIONE.....	46
CONCLUSIONI.....	53
BIBLIOGRAFIA.....	56

LISTA SIMBOLI

- ACh: acetilcolina
- AMPc: Adenosina Monofosfato ciclico
- ApoE: apolipoproteina E
- AJCS: *Ashkenazi Jewish Centenarian Study*
- AD: *Alzheimer Disease*
- ADMA: *Asymmetric DiMethylArginine*
- ATP: Adenosina Trifosfato
- ATPase: ATP idrolasi
- APT-1: *acyl-protein thioesterase-I*
- BH4: Tetraidrobiopteridina
- BPIFB4: *Bactericidal/Permeability-increasing Family B member 4*
- BPI: *Bactericidal Permeability Increasing protein*
- BPIFB4-LAV: *Longevity Associated Variant-BPIFB4*
- BPIFB4-WT: *wild-type-BPIFB4*
- BPIFB4-RV: *Rare Variant-BPIFB4*
- CaM: calmodulina
- CETP: *Cholesteryl Ester Transfer Protein*
- CVD: *CardioVascular Disease*
- COX: ciclossigenasi
- DAF-16: *forkhead transcription factor*
- DAG: Diacilglicerolo
- EDHF: *Endothelium-Derived-Hyperpolarizing Factor*
- eIF2 α : *Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha*
- eNOS: *Endothelium Nitric Oxide Synthase*
- EPC: cellule progenitrici endoteliali
- FAD: Flavinadenindinucleotide
- FMN: Flavinmononucleotide
- GCS: *German Centenarian Study*
- GFP: *Green Fluorescent Protein*
- GSK3: Glicogeno Sintasi Chinasi
- GPCR: Recettori accoppiati alle proteine G
- GWAS: *Genome-Wide Association Study*
- HDL: *High Density Lipoprotein*
- hsp90: *Heat Shock Protein 90*
- IGF-1: *Insulin-like Growth Factor 1*
- iNOS: *Inducible Nitric Oxide Synthase*
- IIS: *Insulin/IGF-1 signaling*
- IP3: inositolo 1,4,5-trifosfato
- iPS: cellule staminali pluripotenti indotte
- IRS: *Insulin Receptor Substrate*

- JCS: *Japanese Centenarian Study*
- LDL: *Low Density Lipoprotein*
- LLI: *Long-Living Individuals*
- L-NAME: N^G-nitro-L-arginina metile estere
- MLCK: *Myosin Light Chain Kinase*
- MLCP: *Myosin Light Chain Phosphatase*
- MNC: *Mononuclear Cells*
- MPT: *Microsomal Transfer Protein*
- Mthfr: *Metilentetraidrofolato reduttasi*
- NADPH: Nicotinamin-deadenindinucleotide fosfato
- NECS: *New England Centenarian Study*
- nNOS: *Neuronal nitric oxide synthase*
- NOS: *Nitric oxide synthase*
- ON: Ossido nitrico
- PE: Fenilefrina
- PERK: *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*
- PGE2: Prostaglandina E2
- PGI2: Prostaciclina
- PIP2: Fosfatidil-inositolo-4,5-difosfato
- PI3K: Fosfatidilinositolo-3-chinasi
- PLC: Fosfolipasi C
- PLTP: *Phospholipid-transfer protein*
- RE: Reticolo endoplasmatico
- ROS: *Radical Oxygen Species*
- Sir2: *Silencing Information Regulator 2*
- SICS: *Southern Italy Centenarian Study*
- SLA: Sclerosi laterale amiotrofica
- SNPs: *Single Nucleotide Polymorphism*
- S1P: Sfingosina 1 fosfato
- TXA2: Trombossano A₂
- TRPV4: *Transient Receptor Potential Vanilloid type4*
- USA: *United States of America*
- VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

INTRODUZIONE

1. La longevità

1.1 Diffusione del fenotipo longevo

Il numero di centenari nella maggior parte delle popolazioni occidentali è cresciuto in modo drastico negli ultimi 100 anni. Agli inizi del secolo scorso negli USA, solo una persona su 100.000 raggiungeva i 100 anni di età, oggi si conta un centenario ogni 6.000 persone e una crescita dell'aspettativa di vita media per le donne di 3 mesi all'anno. Ciò è dovuto sicuramente ai progressi in campo medico ed al miglioramento delle condizioni di vita, che hanno ridotto o eliminato molte delle cause di morte evitabili o curabili. E' proprio per questo, molte più persone sono oggi nelle condizioni di poter arrivare alla loro massima aspettativa di vita, grazie a caratteristiche genetiche o comportamentali che ne facilitano la sopravvivenza fino a tarda età (Perls et al., 2003; Vaupel et al., 1995). Inoltre, attualmente i centenari presentano un declino della loro capacità cognitiva solo negli ultimi anni di vita il che gli permette di mantenere una più alta qualità di vita. Questo li rende un modello di studio per la capacità non solo di raggiungere un'età avanzata, ma anche di ritardare o evitare la disabilità legata all'età e le varie malattie "*age-related*" come il morbo di Alzheimer (Alzheimer Disease: AD), l'ictus, le malattie cardiovascolari, il morbo di Parkinson e il diabete (Terry et al., 2008; Christensen et al., 2008; Hitt et al., 1999).

La diminuzione della disabilità tra i centenari è probabilmente dovuta ad un fenomeno di selezione demografica. Le malattie ad alta mortalità infatti, hanno tipicamente un picco di incidenza in un'età molto più bassa e solo un gruppo selezionato riesce a sopravvivere (Vaupel et al., 1998). A dimostrazione di ciò, nel caso dell'AD il tasso di mortalità raggiunge un plateau ad un'età molto avanzata, oltre i 95 anni.

La salute dei centenari non segue un singolo particolare percorso: infatti, alcuni presentano una malattia cronica già prima degli 80 anni, altri

manifestano i primi sintomi dopo gli 80 e altri ancora arrivano sani ai 100 anni. Queste categorie sono state definite rispettivamente “*survivors*”, “*delayers*” e “*escapers*” e rappresentano percentuali diverse in diverse popolazioni di centenari. Nonostante questo, gli studi sui centenari giapponesi e greci hanno recentemente indicato una prevalenza di *escapers* simile fra i due gruppi (Ozaki et al., 2007; Darviri et al., 2008).

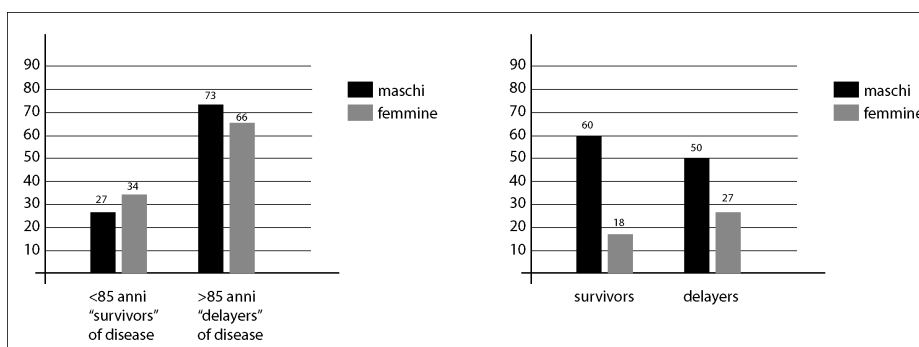


Figura 1. Distribuzione nei due sessi dei centenari delle diverse categorie nella popolazione NECS (New England Centenarian Study). Nel grafico di sinistra sono riportate le percentuali (sull’asse delle ordinate sui singoli istogrammi) di centenari maschi e femmine in cui una patologia compare prima degli 85 anni (*survivors*) oppure dopo gli 85 anni (*delayers*). Analizzando il grafico otteniamo due informazioni principali: per prima cosa che la percentuale dei *delayers* è più che doppia rispetto a quella dei *survivors* in entrambi i sessi e, in secondo luogo, che le femmine prevalgono tra i *survivors* mentre i maschi tra i *delayers*. Nel grafico di destra è rappresentata la percentuale di maschi e femmine appartenenti alle due categorie di “*survivors*” e “*delayers*” in grado di trascorrere una vita funzionalmente indipendente a più di 97 anni. In entrambe le categorie i soggetti di sesso maschile presentano percentuali decisamente più elevate rispetto ai soggetti femmina.

Come evidenziato in figura 1, da uno studio effettuato sulla popolazione di centenari del New England (New England Centenarian Study: NECS)

(Terry et al., 2008) si sono rilevate differenze significative nella distribuzione dei centenari tra i due sessi nelle diverse categorie.

Le femmine presentano generalmente una casistica maggiore di soggetti ultracentenari rispetto ai maschi. Per il genere maschile è più alta, invece, la percentuale di coloro che trascorrono una vita indipendente a livello funzionale dopo i 97 anni, sia per gli individui che sopravvivono ad una patologia (*survivors*) che per quelli in cui la manifestazione di una patologia tipica della vecchiaia ritarda (*delayers*). Questi individui presentano, in pratica, punteggi più alti nei test che misurano le capacità fisiche e mentali. Questi ultimi, sembrano però in grado di arrivare oltre i 100 anni con una migliore qualità di vita.

1.2 Le popolazioni di ultracentenari

La diversa distribuzione geografica dei centenari suggerisce che occorre studiare il fenomeno a livello di singole popolazioni. Il contributo dell'ambiente alla salute dell'individuo è importante, ma ciò che incide maggiormente sull'eterogeneità delle frequenze di ultracentenari nelle diverse popolazioni sono le differenze genotipiche fra le popolazioni stesse, determinate dal background etnico di ogni popolazione isolata. Una popolazione di questo tipo prevede una bassa rilevanza dei fenomeni d'immigrazione e, molto spesso, una significativa frequenza di unioni tra consanguinei (*inbreeding*), che porta ad un rafforzamento dei tratti genotipici caratteristici della popolazione stessa.

Sulla base di queste considerazioni, sono stati creati nel mondo numerosi consorzi che raccolgono individui centenari di popolazioni isolate e ne studiano le specifiche caratteristiche genotipiche. Fra questi studi, vale la pena di menzionare il NECS, iniziato nel 1994 come studio di popolazione basato su tutti i centenari viventi all'interno di 8 città dell'area di Boston e, dal 2000, ha espanso l'arruolamento a tutti gli USA, arrivando ad un campione di circa 1000 soggetti con età compresa tra i 100 e i 109 anni

(Perls et al., 1999). Sempre negli USA, lo studio Elixir Pharmaceuticals American Centenarians è uno screening dei centenari di tutti gli USA, effettuato tra il 2001 e il 2003 e analizza 500 soggetti tra i 92 e i 107 anni. Altri studi sono l'Ashkenazi Jewish Centenarian Study (AJCS), iniziato nel 1995 e comprendente 600 soggetti con più di 95 anni (Barzilai et al., 2006), il Japanese Centenarian Study (JCS), che arruola centenari da tutto il Giappone (550 soggetti), con particolare attenzione al reclutamento dei cosiddetti "semi-supercentenari" (con più di 105 anni di età) e il German Centenarian Study (GCS), che arruola 763 soggetti con età tra i 94 e i 110 anni provenienti da diverse regioni della Germania (Nebel et al., 2005). Infine, in questo contesto si inserisce anche il Southern Italy Centenarian Study (SICS), portato avanti da "Istituto Longevità" a partire dal 2002 su 600 nonagenari/centenari, (età compresa tra i 90 e i 109 anni) e 800 giovani controlli (età compresa tra 18-48 anni). Questi soggetti appartengono ad una popolazione proveniente da una regione isolata a sud-est di Napoli con un'alta concentrazione di soggetti molto anziani e in salute e caratterizzata da un alto livello di inbreeding.

1.3 Complessità del fenotipo longevo: ereditarietà ed ambiente

È stato dimostrato che una parentela di primo grado con un soggetto centenario dà un significativo vantaggio di sopravvivenza con alte possibilità di raggiungimento dei 100 anni. L'analisi di 444 famiglie di ultracentenari negli USA, che ha incluso 2092 fratelli di longevi, ha indicato un vantaggio netto di 16 anni di sopravvivenza del fratello di uno di loro rispetto alla popolazione generale (Perls et al., 2002). Dall'età di 20 anni fino ai 100, inoltre, i fratelli di centenari presentano generalmente la metà del rischio di mortalità dei loro coetanei, come illustrato in figura 2, evidenziando il potere protettivo del loro corredo genotipico.

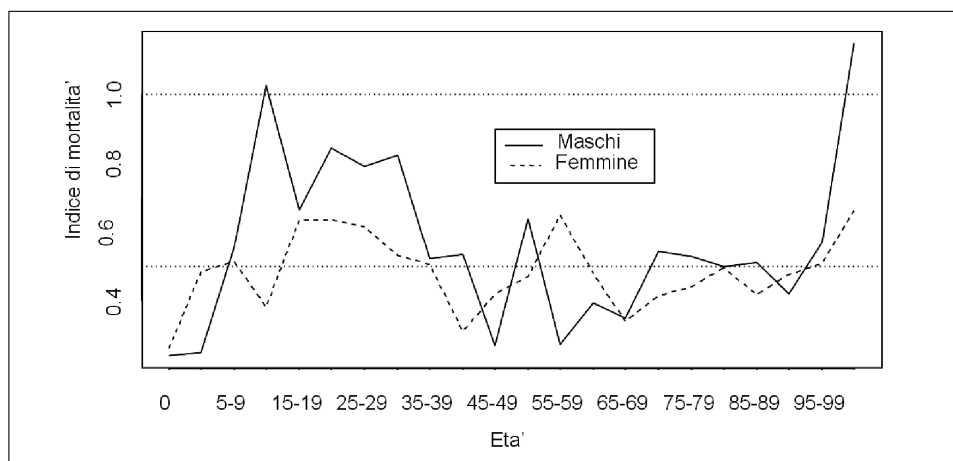


Figura 2. Indice di mortalità nei fratelli di centenari (Perls et al., 2002). Il grafico mostra l'andamento dell'indice di mortalità nei fratelli di centenari, calcolato sulla base del rapporto della mortalità con l'esposizione al rischio in relazione all'età. L'indice di mortalità della popolazione di controllo ha un valore medio di 1.0 (linea punteggiata in alto), mentre nei fratelli di centenari si attesta sullo 0.5 per entrambi i sessi (linea punteggiata in basso).

L'ereditarietà del tratto longevo si evince dalla riduzione di mortalità nei parenti di centenari. Infatti, i fratelli dei centenari hanno una probabilità di raggiungere a loro volta la soglia dei 100 anni fino a 18 volte maggiore di quella della popolazione generale. A conferma di ciò, anche i figli di ultracentenari vivono più a lungo e con un rischio inferiore di mortalità rispetto al resto della popolazione a cui appartengono (Terry et al., 2004).

Sono stati effettuati diversi studi anche sui gemelli, evidenziando che gemelli monozigotici nati tra il 1870 e il 1910 nelle popolazioni danese, finlandese e svedese presentano un indice di mortalità concordante (Herskind et al., 1996).

Questi studi mostrano chiaramente che il contributo genetico è fondamentale per la longevità, ma anche che l'aumento dell'aspettativa di

vita media che si è verificato in tempi recenti non può dipendere solo dalla componente genetica, essendo il genoma umano praticamente immutato rispetto ad un secolo fa. Il recente incremento del numero dei centenari è quindi legato necessariamente all'ambiente, che influisce non solo per le condizioni fisiche di vita, ma anche per fattori psico-sociali.

In conclusione, la complessità fenotipica dell'estrema longevità è determinata da innumerevoli fattori, che possono intervenire simultaneamente portando un contributo positivo o negativo al processo di invecchiamento (Figura 3). L'organismo esposto all'azione di agenti lesivi endogeni ed esogeni, inoltre, tenta di mantenere l'omeostasi attraverso un sistema di meccanismi di difesa e di riparazione finemente controllato dai geni e definito anche *network* antinvecchiamento; l'invecchiamento deriva, dunque, dal deterioramento di tale sistema, mentre la longevità dipende dalla sua efficienza.

La malattia, quindi, non insorge perché le cellule invecchiano, ma perché i cambiamenti che si accumulano con l'età, oltre un certo limite, rendono impossibile l'adattamento e l'omeostasi a livello cellulare prima e dell'intero organismo poi (Tafaro et al., 2007).

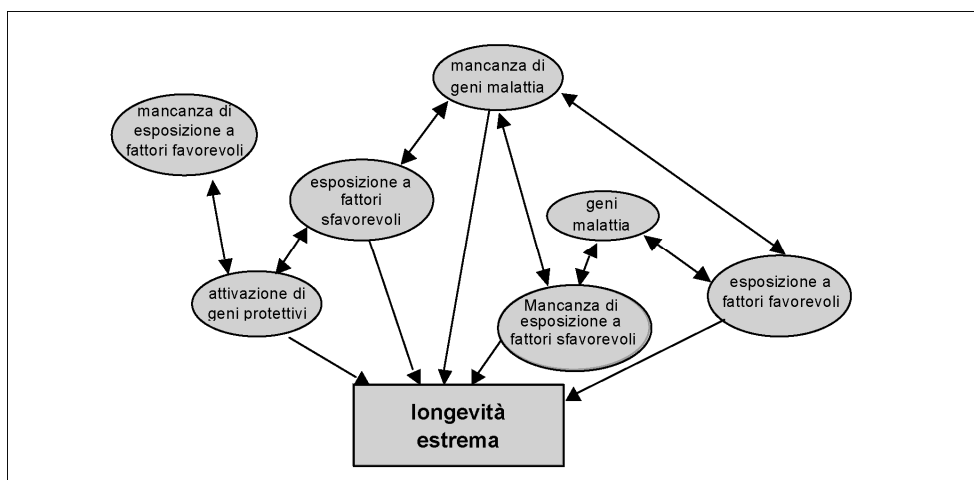


Figura 3. Complessità della rete di eventi che porta al fenotipo *longevo*. Sono schematizzati gli eventi principali che influiscono sulla comparsa del fenotipo di longevità estrema, agendo in modo combinato e apportando contributi deleteri, benefici o anche neutri.

1.4 Contributo del corredo genetico alla longevità

Nonostante i centenari siano esposti alle stesse condizioni di inquinamento ambientale, essi hanno la capacità di comprimere e spingere la morbilità e la mortalità verso la fine della loro vita. Geneticamente questa compressione è correlata all'arricchimento nel genoma di alleli protettivi e alla perdita di quelli nocivi. È stato stimato che le varianti geniche contribuiscono mediamente alla lunghezza della vita umana per circa il 25%, mentre ricoprono un ruolo ancor più significativo nella popolazione longeva. Un esempio di questa selezione demografica è la diminuzione della frequenza dell'allele $\epsilon 4$ nel gene che codifica per l'apolipoproteina E (*ApoE*) nella maggior parte dei centenari caucasici, legata all'associazione di questo allele con L'AD, con un aumento del rischio di tre volte, e con l'aterosclerosi prematura, una patologia vascolare (Singh et al., 2006; Corder et al., 1993). Anche l'allele $\epsilon 2$ dello stesso gene è implicato nel processo di invecchiamento, ma sembra avere un valore protettivo contro lo sviluppo del morbo di Alzheimer e la sua frequenza allelica risulta incrementata tra i centenari. Tale variante allelica risulta inoltre correlata all'iperlipidemia di tipo III e IV (Sobel et al., 1995; Schachter et al., 1994; Rebeck et al., 1994).

Oltre agli alleli di *ApoE*, che è il gene più studiato e più notoriamente implicato nell'invecchiamento, ci sono diversi casi di alleli associati a vantaggi di sopravvivenza.

Un altro esempio è il gene *MTP* che si trova sul cromosoma 4 nel locus q25 e codifica per la *Microsomal Transfer Protein*, studiata per la sua funzione nell'assemblaggio delle lipoproteine e come potenziale bersaglio per

terapie contro iperlipidemia e obesità. Studi effettuati inizialmente su 137 centenari e rispettivi 171 fratelli nella popolazione NECS sono stati in seguito replicati su ulteriori 200 centenari e 200 controlli, analizzando più di 1000 polimorfismi genici in quella regione. Si è osservato che la variante -493 G/T del promotore era sottorappresentata nei soggetti longevi. Tale dato è stato confermato anche in una popolazione di 250 ultracentenari americani (Geesaman et al., 2003).

Uno studio su centenari ebrei Ashkenazi e rispettive famiglie, invece, ha dimostrato che le particelle di *High Density Lipoprotein* (HDL) e *Low Density Lipoprotein* (LDL) sono di dimensioni significativamente maggiori nei centenari e nei loro figli e che la loro dimensione varia anche tra i soggetti sani e pazienti con patologie cardiovascolari, ipertensione e sindromi metaboliche. Il gene implicato in queste differenze è risultato essere *CETP* (*Cholesteryl Ester Transfer Protein*), che codifica per una proteina colesterolo transferasi (Barzilai et al., 2003). Studi successivi hanno trovato l'implicazione di questo gene anche nei meccanismi legati all'aspetto neuro-degenerativo della vecchiaia, assegnandogli un ruolo protettivo contro il morbo di Alzheimer e la demenza senile.

Inoltre, l'interruzione nell'espressione del gene *KLOTHO*, codificante per una proteina della superficie cellulare il cui dominio extracellulare può agire da ormone solubile, accelera l'invecchiamento nei modelli murini. Viceversa l'aumento della sua espressione porta un incremento di circa il 19% nella durata della vita. Non si conosce il meccanismo preciso con cui *KLOTHO* agisce sulla longevità, ma si è scoperto che agisce negativamente sul sistema di trasduzione del segnale dell'insulina e regola l'omeostasi del fosforo e del calcio interagendo con il fattore di crescita dei fibroblasti FGF2 e la sodio-potassio ATPasi.

Recentemente è stato perfezionato uno studio caso-controllo condotto su cinque geni candidati all'associazione con il fenotipo longevo e implicati nell'Insulin/IGF-1 signaling pathway (IIS). Questo studio è stato condotto su

una popolazione giapponese comprendente 213 ultracentenari maschi, con un'età media di 98 anni, e 402 controlli maschi con età media di 78 anni. Quest'analisi ha riscontrato l'associazione con il fenotipo longevo di tre polimorfismi, nel locus *FOXO3A*. Questi risultati indicano che l'implicazione di queste varianti alleliche di *FOXO3A* nel processo di invecchiamento è molto marcata e che sicuramente questa associazione è valida per i soggetti maschili. I dati ottenuti sulla popolazione giapponese sono stati replicati da uno studio effettuato su una popolazione tedesca, che ha analizzato 1762 individui, di cui 388 centenari, 643 nonagenari e 731 controlli con un'età media di 70 anni. L'associazione con il fenotipo longevo è risultata molto forte, soprattutto negli individui ultra-centenari, per i quali si sono registrati i valori più significativi. L'associazione di *FOXO3A* con il fenotipo longevo è stata riscontrata anche nella popolazione italiana del SICS, di cui 480 individui longevi (età media di 95 anni) e 335 controlli con un'età media di 32 anni sono stati genotipizzati per un polimorfismo strettamente correlato a quello degli altri due studi.

Nella stessa popolazione italiana, è stata identificata la variazione rs10491334 nel gene *CAMK4*. Tale polimorfismo era già stato associato con l'elevata pressione diastolica del sangue nel Framingham Heart Study. Il fatto che rs10491334 associ anche con l'ipertensione, indica che ipertensione e longevità sono regolati da pathways comuni. Rs10491334 è correlata con l'espressione di *CAMK4* e studi funzionali hanno rilevato la capacità di questa proteina di modulare *SIRT1* e *FOXO3A*.

Un'altra variante associata alla longevità nella popolazione italiana è rs697739 nel gene *Ataxin-1*. Questo polimorfismo era stato precedentemente associato con l'età di manifestazione della sclerosi laterale amiotrofica (SLA), una patologia con cause sconosciute caratterizzata dalla lenta degenerazione dei moto-neuroni che colpisce tra i 40 e i 60 anni.

1.5 Pathways coinvolti nel processo d'invecchiamento

Gli studi effettuati fino ad ora hanno evidenziato l'influenza sul processo d'invecchiamento di modifiche in due sistemi cellulari importanti: il pathway dell'insulina e il sistema di risposta allo stress ossidativo. Il primo è collegato alla degenerazione del sistema cardio-vascolare, alla gestione dei nutrienti e alla patogenesi di diabete, iperlipidemia, ipertensione ed infarto; il secondo, invece, protegge l'organismo dalle specie reattive dell'ossigeno (radicali liberi). Questi due sistemi sono solo apparentemente indipendenti, in quanto sono collegati attraverso una fitta rete di cascate di trasduzione di segnali intracellulari che spesso modulano gli stessi bersagli.

Per quanto riguarda il pathway insulinico, il primo gene ad essere studiato è stato PAX2 age-1 di *C. Elegans* (Friedman et al., 1988), che codifica per la fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) e che ha un ruolo chiave in una cascata di trasduzione del segnale simile al pathway di IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) nei mammiferi. A sua volta IGF-1 ha un ruolo nell'invecchiamento (Figura 4) ed è stato dimostrato che l'attivazione del pathway PIK3/Akt da parte di IGF-1 in *C. elegans* sopprime l'attività di DAF-16 (forkhead transcription factor), omologo della proteina FOXO nei mammiferi (McElwee et al., 2003; Murphy et al., 2003; Kaestner et al., 2000).

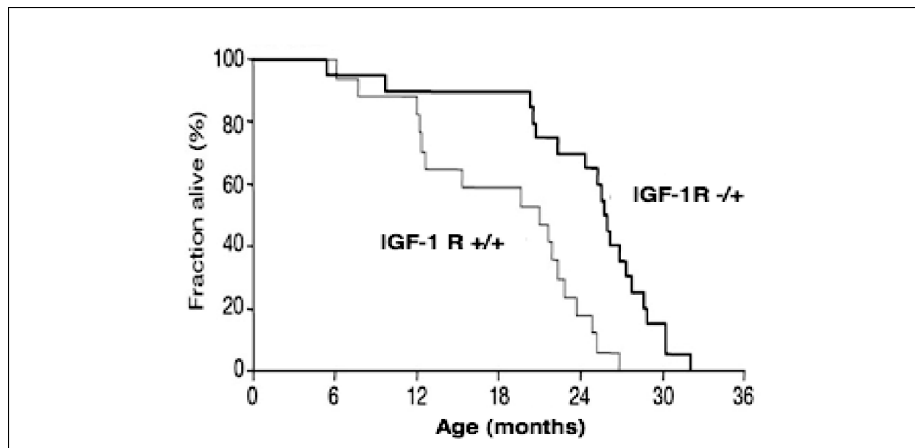


Figura 4. Legame tra longevità ed esposizione a IGF-1. Il grafico mostra la durata della vita media di esemplari di *C. Elegans* omozigoti per il gene del recettore insulinico (IGF-1R^{+/+}) e di esemplari eterozigoti (IGF-1R^{+/-}). Si nota che l'inattivazione del recettore insulinico, causata dalla mutazione dominante, e quindi la mancata attivazione del pathway di Akt porta ad un incremento della lunghezza della vita (Holzenberger et al., 2003).

L'insulina è un ormone rilasciato dalle cellule β del pancreas in risposta ad elevati livelli di nutrienti nel sangue. Essa scatena la trasformazione del glucosio, degli acidi grassi e degli amminoacidi in tessuto adiposo, mentre promuove il deposito di questi nutrienti sotto forma di glicogeno, lipidi e proteine rispettivamente nel muscolo e nel fegato. Il fallimento di questi processi di trasformazione e stoccaggio portano al diabete di tipo 1, caratterizzato dall'incapacità di sintetizzare insulina, oppure di tipo 2, quando l'individuo diventa resistente agli effetti dell'insulina, presumibilmente a causa di difetti nel sistema di trasduzione del segnale dell'insulina stessa.

L'insulina si lega ad uno specifico recettore transmembrana provocandone la dimerizzazione e la successiva autofosforilazione sui residui tirosinici dei domini intracellulari dello stesso. A questi domini si lega la proteina IRS (Insulin Receptor Substrate) che viene riconosciuta e legata dalla chinasi

lipidica PI3K. Quest'ultima fosforila a livello della membrana la fosfatidilinositolo 4,5 bifosfato, che diventa trifosfato e recluta sulla membrana il principale effettore della cascata, Akt. Akt attivato entra nel citoplasma e fosforila diversi substrati, fra cui la Glicogeno Sintasi Chinasi (GSK3), che viene così inattivata, causando il blocco della sintesi del glicogeno da una parte e l'incremento della sintesi proteica dall'altra. Inoltre, Akt sopprime l'attività della famiglia di fattori di trascrizione FOXO. In particolare, la fosforilazione Akt-dipendente di questi fattori di trascrizione impedisce loro di entrare nel nucleo e di legarsi alle sequenze di DNA specifiche nei promotori dei loro geni bersaglio, che sono a loro volta coinvolti in numerosi eventi cellulari importanti, fra cui eventi apoptotici, di riparazione del DNA, di arresto del ciclo cellulare e metabolici, quali la gluconeogenesi.

La relazione tra riduzione nell'assunzione di nutrienti, ritardo dell'invecchiamento ed incremento della longevità è stata analizzata in dettaglio in modelli murini. Tale relazione, già nota in tantissimi organismi, dal lievito ai mammiferi, è attribuita alla riduzione dei livelli di specie reattive dell'ossigeno prodotte durante la respirazione in condizioni di restrizione calorica, anche se i meccanismi molecolari di questo fenomeno non sono ancora completamente chiari. In particolare, è stato osservato che i livelli di una deacetilasi NAD-dipendente (Sir2, Silencing Information Regulator 2), che ha un ruolo chiave nello stile di vita modulato sulla restrizione calorica, aumentano in ceppi *S. Cerevisiae* che presentano un fenotipo longevo. Inoltre, aumentando il numero di copie di sir-2.1, ortologo di SIR2 in *C. Elegans*, la vita dei nematodi aumenta dal 15 al 50%, mentre un aumento della sua espressione in *Drosophila* allunga la vita fino del 30% (Greer et Brunet, 2008; Lin et al., 2000).

Nei mammiferi esistono 7 diverse Sirtuin proteins, la cui implicazione nel processo dell'invecchiamento non è chiara, anche se diversi esperimenti indicano che sono strettamente legate ad esso. In particolare, topi *Sirt6*^{-/-}

manifestano segni di invecchiamento accelerato (Mostoslavsky et al., 2006), mentre un polimorfismo in SIRT3 umano è collegato con una maggiore sopravvivenza nei centenari. Il Sirtuin pathway, inoltre, interseca quello insulinico/IGF-1 interagendo con i fattori di trascrizione FOXO. Infatti, uno degli orologi umani di Sir2, SIRT1, forma un complesso con FOXO3A in risposta agli stress ossidativi, inducendo così arresto del ciclo cellulare e resistenza agli stress ossidativi. Inoltre, è stato osservato che la capacità di Sir2 di allungare la vita è legata alla presenza dei fattori di trascrizione FOXO, senza i quali la deacetilasi perderebbe il suo substrato e la capacità di indurre resistenza ad agenti ossidanti. L'interazione tra SIRT1 e FOXO3A avviene nel nucleo, dove la prima è presente costitutivamente, mentre la seconda vi trasloca sotto lo stimolo degli agenti ossidanti o dei fattori di crescita (Brunet et al., 2004).

E' plausibile che le varianti geniche che hanno un impatto sulla longevità, sono a carico di geni espressi selettivamente in alcuni tessuti e/o in alcuni stati di differenziazione. Sebbene l'invecchiamento è considerato un adattamento evoluzionistico per combattere il cancro attraverso l'attivazione di processi come la senescenza cellulare, ci sono stimoli in grado di attivare risposte cellula-specifiche, come ad esempio l'induzione di apoptosi nelle cellule tumorali e l'induzione di sopravvivenza nelle cellule sane da parte della stessa proteina: la chinasi AMPK. Quest'ultima, infatti, riconosce i livelli elevati di AMP e viene attivata dalla restrizione calorica, dall'esercizio fisico, dalla metformina e dagli amminoacidi essenziali. Inoltre, AMPK induce biogenesi mitocondriale, autofagia e beta-ossidazione degli acidi grassi. La riduzione di questi ultimi causa diabete, obesità e, in ultima analisi, invecchiamento.

AMPK agisce su eNOS implicato nei meccanismi della vasodilatazione vascolare e della migrazione delle cellule endoteliali attraverso CXCR4. Il legame con l'invecchiamento è chiaro nei modelli in cui eNOS è stato

inattivato, i quali non reagiscono alla restrizione calorica e presentano una mortalità più elevata.

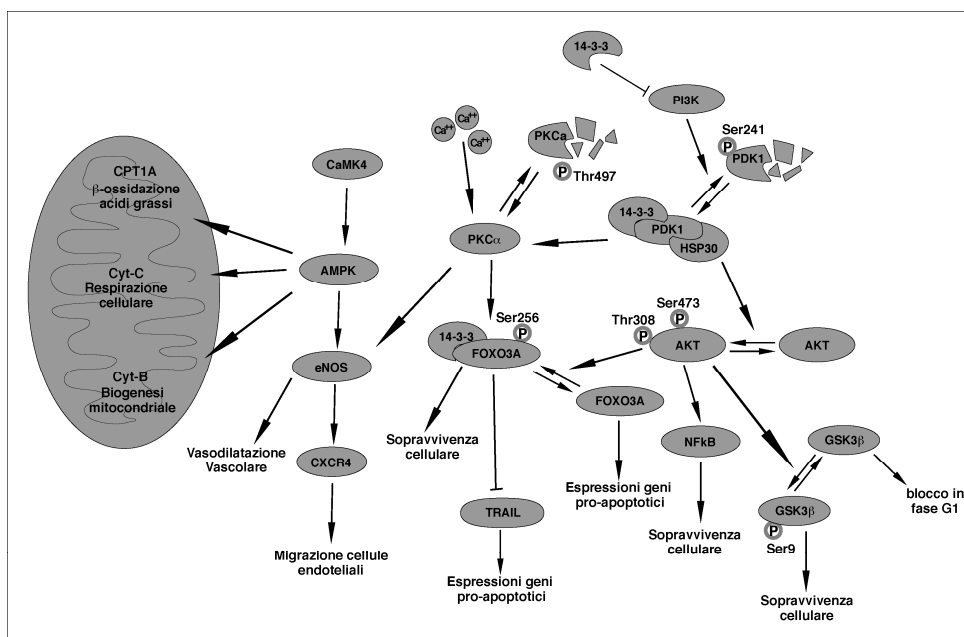


Figura 5. Network dei principali players che condizionano il processo d'invecchiamento.

Lo studio dei figli dei centenari, infine, ha rivelato alcuni biomarcatori di longevità, come ad esempio il basso livello di heat shock proteins nel sangue oppure alti quantitativi di acido palmitoleico nelle membrane con un basso indice di perossidazione; inoltre, i centenari hanno buona tolleranza al glucosio e normale attività insulinica, nonché una bassa variabilità della frequenza cardiaca.

2. Ossido nitrico e ossido nitrico sintasi (NOS)

L'ossido nitrico (ON) è una molecola radicalica gassosa che svolge un ruolo importante in diversi processi biologici tra cui la vasodilatazione, la neurotrasmissione, la cicatrizzazione delle ferite e la regolazione delle difese immunitarie (Moncada et al., 1991). Presenta un'emivita molto breve e perciò agisce solo in prossimità delle cellule che lo producono.

Grazie alle sue piccole dimensioni ed alla mancanza di carica, l'ON può diffondere liberamente attraverso le membrane cellulari senza bisogno di un sistema di trasporto. In condizioni fisiologiche esso è ossidato a NO^{-2} e NO^{-3} .

La sintesi dell'ON avviene ad opera dell'enzima ossido nitrico sintasi (NOS), del quale ne esistono tre isoforme sintetizzate da tre geni differenti: endothelial nitric oxide synthase (eNOS), neuronal nitric oxide synthase (nNOS) e inducibile nitric oxide synthase (iNOS).

L'enzima NOS presenta una struttura formata da due domini: uno ossigenasico N-terminale che contiene siti di legame per l'eme, la tetrabioperidina (BH_4) e L-arginina, ed uno reduttasico C-terminale con i siti di legame per la flavinadenindinucleotide (FAD), la flavinmononucleotide (FMN) e la nicotinamin-deadenindinucleotide fosfato (NADPH). Tra i due domini si trova il sito di riconoscimento per la calmodulina (CaM). Affinché NOS sia attivo è necessario che esso dimerizzi interagendo tramite i due domini ossigenasici (Alderton et al., 1998; Crane et al., 2001). E' presente anche uno ione zinco, coordinato in forma tetraedrica con due sequenze CysXXXXCys (uno per ogni monomero) che stabilizza il dimero ma non agisce sull'attività enzimatica (Hemmens et al., 2000; Raman et al., 1998).

Tutte e tre le isoforme di NOS catalizzano la reazione che a partire dall'L-arginina, il NADPH e l' O_2 porta alla formazione del NADP, della citrullina e dell'ON (Figura 6) (Förstermann et al., 2012).

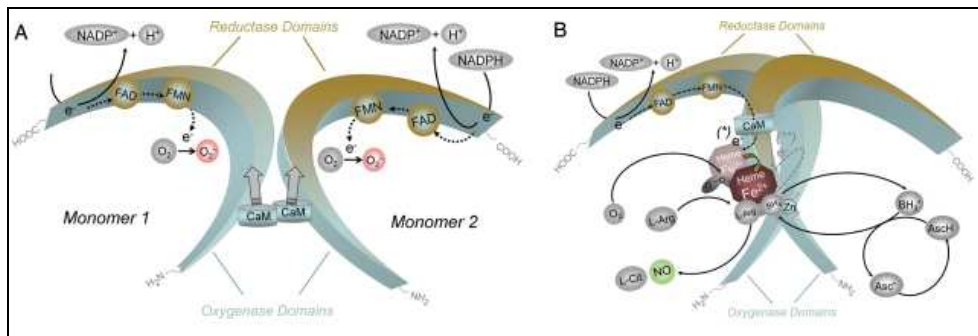


Figura 6. Struttura e meccanismo d'azione di NOS. A) I monomeri NOS sono in grado di trasferire gli elettroni dal NADPH al FAD e FMN e possono ridurre l'ossigeno molecolare in superossido ($O_2^{\bullet -}$). Essi inoltre possono legare la CaM, che potenzia la capacità di trasferimento degli elettroni al dominio reduttasico, ma non legando il cofattore BH4 e il substrato L-arginina non possono catalizzare la formazione di ON. B) Il dimerico funzionale di NOS trasferisce gli elettroni dal NADPH, nel dominio reduttasico C-terminale, al gruppo eme legato al dominio ossigenasico N-terminale, attraverso FAD e FMN. Al sito eme, gli elettroni vengono utilizzati per ridurre e attivare l' O_2 e per ossidare l' L-arginina a L-citrullina e ON. In particolare, la sintesi dell'ON avviene in due step: prima L-arginina viene idrossilata a N^{ω} -idrossi-L-arginina (che rimane legata all'enzima), questa poi viene ossidata ad L-citrullina e ON. Tutte le isoforme di NOS si legano alla CaM, che rende più veloce il flusso di elettroni tra i due domini dell'enzima. In nNOS ed eNOS il legame avviene in seguito ad un incremento delle concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} (200-400nM), nel caso di iNOS la CaM è legata già in presenza di bassissime concentrazioni di Ca^{2+} (40nM) grazie ad una diversa struttura amminoacidica del sito d'interazione (Förstermann et al., 2012).

2.1 eNOS

eNOS è il principale responsabile della produzione di ON a livello delle cellule endoteliali. Esso è soggetto a numerose modifiche post-traduzionali che ne rendono possibile la stimolazione dinamica e l'inibizione dell'attività enzimatica in risposta ai diversi stimoli fisiologici e fisiopatologici.

Nelle cellule quiescenti, eNOS è specificamente trasportato a livello delle caveole, piccole invaginazioni della membrana plasmatica caratterizzate dalla presenza di una proteina "scaffold", la caveolina. Le caveole sono

ricche in colesterolo e sfingolipidi che rendono la membrana meno fluida, questo sembra agevolare le interazioni proteina-proteina e proteina-lipidi necessarie per i meccanismi di trasduzione del segnale (Govers et al., 2001; Shaul et al., 1998). Le caveole infatti, sequestrano diversi recettori e proteine coinvolte nel signaling cellulare, compresi i recettori accoppiati alle proteine G (GPCR), i recettori per i fattori di crescita e le proteine coinvolte nella regolazione del calcio. Le caveole potrebbero perciò posizionare eNOS in modo da facilitare la ricezione dei segnali a monte e la comunicazione con gli attivatori a valle (Shaul et al., 1999).

La localizzazione di eNOS a livello della caveole dipende dalla miristilazione irreversibile della glicina N-terminale da parte della N-miristiltrasferasi. La miristilazione indirizza inizialmente N-Myr-eNOS alla membrana plasmatica, dove avviene la palmitolazione reversibile dei residui Cys15 e Cys26 (Shaul et al., 2002; Prabhakar et al., 2000). La miristilazione e la palmitolazione permettono ad eNOS di ancorarsi al doppio strato lipidico delle caveole. La de-palmitolazione di eNOS (ad opera dell'acyl-protein thioesterase-I; APT-1) permette una regolazione dinamica di eNOS, che si stacca dalle caveole e può essere attivato (Dudzinski et al., 1998).

La fosforilazione rappresenta, assieme alla miristilazione, la palmitolazione ed all'interazione con CaM, il principale meccanismo di regolazione post-traduzionale dell'attività di eNOS. In particolare, la fosforilazione sulle Ser1177, Ser635 Ser617 ha una funzione attivatrice, mentre quella sulla Thr495 e sulla Ser116 ha un'azione inibitoria (Bauer et al., 2003). La fosforilazione della Ser1177 è catalizzata da numerose chinasi, tra cui Akt, PKA, AMPK, PKG, CaMKII e PKC α , tutte in grado di stimolare l'attività enzimatica di eNOS (Fulton et al., 2001; Fleming et al., 2001). Essa inibisce la dissociazione della CaM (McCabe et al., 2000; Dimmeler et al., 1999). La fosforilazione sulla Ser 617, che si verifica a valle di PKA o Akt, sembra favorire l'interazione con CaM (Michell, 2002) e modulare la

fosforilazione su altri residui (Bauer et al., 2003). Quella sul residuo Ser 635 aumenta l'attività eNOS in risposta ad agonisti che agiscono sulla PKA, nonché a stimoli meccanici come lo "shear stress" (l'attrito che il flusso sanguigno esercita sulle pareti del vaso) (Michell et al., 2002). La fosforilazione della Thr495, a valle della proteina chinasi C (PKC) e AMPK (Fulton et al., 2001), riduce il legame tra eNOS e CaM, al contrario della sua de-fosforilazione (ad opera della fosfatasi A2) (Fleming et al., 2001) che invece lo favorisce. In fine, la fosforilazione di eNOS sulla Ser116 ne inibisce l'attività enzimatica, mentre la sua de-fosforilazione è promossa da VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Kou et al., 2002).

2.1.1 Meccanismi di attivazione di eNOS

I recettori GPCR sono coinvolti nella maggior parte delle vie di trasduzione del segnale che determinano l'attivazione di eNOS. A valle di GPCR e della proteina G eterotrimerica sono stati identificati essenzialmente due meccanismi: la mobilitazione del Ca^{2+} intracellulare, e la via PI3K/Akt.

Tra i ligandi di GPCR che mediano un aumento delle concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} vi sono la bradichinina (attraverso i recettori B_2), l'acetilcolina (attraverso i recettori M2), l'istamina, l'adenosina, l'ADP/ATP, la sfingosina 1 fosfato (S1P) e la trombina (Dudzinski et al., 2006). L'interazione con GPCR determina l'attivazione della fosfolipasi C (PLC), che catalizza la formazione di inositolo 1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerolo (DAG) a partire dal fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato. L' IP_3 interagendo con i recettori specifici determina il rilascio di Ca^{2+} dal RE (Loscalzo et al., 1995). Quest'ultimo attiva la CaM che si lega ad eNOS favorendone il distacco dalla caveolina. L'abilità della CaM di interagire e attivare eNOS può essere inibita invece, dalla chinasi CK2 (Greif et al., 2004).

Diverse molecole, tra cui il VEGF, alcuni ormoni (estrogeni, platelet-derived lipid mediators), e lo shear stress possono influenzare l'attività di eNOS attraverso il pathway di PI3K/Akt (Dudzinski et al., 2006). La chinasi Akt è

uno dei principali responsabili della fosforilazione di eNOS sulla Ser1177, e della sua conseguente attivazione sia a livelli basali sia in seguito alla stimolazione da parte di diversi agonisti. Akt è prevalentemente presente nel citosol in forma inattiva e la traslocazione a livello della membrana plasmatica ne determina l'attivazione consentendogli di fosforilare eNOS. Essa è sotto il controllo del pathway di PI3K, che la recluta a livello della membrana e la fosforila (Gonzalez et al., 2002).

Il VEGF è uno dei più potenti attivatori di eNOS. Il legame di VEGF alla famiglia di recettori tirosin chinasi (tra cui vi è KDR) determina l'attivazione di PI3K α e PI3K β (Kou et al., 2002). La conseguente fosforilazione della Ser1177 di eNOS si ha entro cinque minuti dal legame dell'agonista ed è accompagnata da una rapida de-nitrosilazione dell'enzima (Erwin et al., 2005). VEGF è inoltre in grado di determinare la de-fosforilazione della Ser116 da parte della calcineurina (Kou et al., 2002). L'insulina è un vasodilatatore e attiva eNOS attraverso un recettore specifico tirosin chinasi a monte di PI3K (Montagnani et al., 2001).

Un ruolo particolarmente importante nel meccanismo di attivazione di eNOS è svolto dalla proteina hsp90 (heat shock protein 90) che, una volta fosforilata, si associa ad eNOS in risposta allo stimolo di diversi agonisti (Harris et al., 2000). Il legame di hsp90 stimola l'attività di eNOS aumentando l'affinità per la CaM e facilitando l'interazione dell'eme. Hsp90 è in grado di legare Akt sia nella sua forma attiva che in quella inattiva ed è necessaria perché essa possa interagire con eNOS. Inoltre, protegge PI3K dalla degradazione proteosomica, favorendo lo stato fosforilato e quindi attivo di Akt (Wei et al., 2005). L'azione sinergica di hsp90 e Akt è in grado di attivare eNOS sia a concentrazioni fisiologiche di Ca^{2+} che in maniera indipendente da esso.

E' infine necessario segnalare l'azione inibitoria dell'ON su hsp90, esercitata tramite la S-nitrosilazione di un residuo di Cys. Tale

modificazione inibisce la funzione ATPasica di hsp90 e potrebbe rompere il legame eNOS-hsp90 (Martínez-Ruiz et al., 2005).

3. eNOS, l'invecchiamento vascolare e la longevità

3.1 La vasodilatazione indotta dall'endotelio

L'endotelio è il tessuto che riveste la superficie interna dei vasi e svolge un ruolo fondamentale nel mantenere l'omeostasi vascolare attraverso la produzione di numerose sostanze che agiscono nel vaso. In particolare le cellule endoteliali inducono la vasodilatazione attraverso la produzione di tre fattori:

- ON
- Prostaciclina (PGI₂)
- Endothelium-Derived-Hyperpolarizing Factor (EDHF)

La liberazione di queste sostanze può essere indotta da stimoli di tipo meccanico come lo shear stress, o da stimoli di tipo biochimico, quali l'acetilcolina (ACh), l'istamina, la bradichinina, la serotonina.

Essendo una sostanza molto lipofila e priva di carica, l'ON attraversa agevolmente la membrana plasmatica e agisce sulle cellule muscolari lisce del vaso, causando vasodilatazione. In particolare, l'ON attiva la guanilciclasi e determina un conseguente aumento intracellulare dell'GMPc.

La cellula endoteliale può metabolizzare l'acido arachidonico e produrre PGI₂, prostaglandina E₂ (PGE₂) e piccole quantità del trombossano TXA₂. La prostaciclina agisce incrementando l'AMPc in sinergia con il NO, sia nelle cellule della muscolatura liscia vascolare che delle piastrine e, favorendo la vasodilatazione e agendo da antiaggregante piastrinico. La fosfolipasi A₂ agendo sui fosfolipidi di membrana libera acido arachidonico che viene metabolizzato dall'enzima ciclo-ossigenasi, producendo endoperossidi di prostaglandine. Da queste, grazie all'attività della prostaciclina-sintetasi, si ottiene la PGI₂. Essa agisce localmente, causando vasodilatazione e contrastando l'aggregazione piastrinica. Inoltre può incrementare l'attività degli enzimi che provvedono al

metabolismo degli esteri del colesterolo nella cellula muscolare liscia, inibendone l'accumulo da parte dei macrofagi e prevenendo la liberazione dei fattori di accrescimento che causano l'ispessimento della parete vascolare.

L'EDHF è un altro mediatore con azione vasodilatatoria prodotto dall'endotelio e non ancora ben definito. Esso determina una temporanea iperpolarizzazione della cellula muscolare liscia tramite l'attivazione dei canali ATP-dipendenti del potassio o del sodio/potassio o entrambi, determinando infine un aumento del calcio intracellulare.

3.2 L'invecchiamento vascolare

Le malattie cardiovascolari (CVD) sono una delle principali cause di morbidità e mortalità negli anziani (Lakatta and Levy, 2003). Quando si parla di "invecchiamento vascolare" ci si riferisce a tutte quelle alterazioni strutturali e funzionali che interessano i vasi sanguigni e che si manifestano durante il processo di invecchiamento (Herrera et al., 2010). Esse possono interessare sia le cellule della muscolatura liscia che quelle della tunica intima e portano a disfunzioni endoteliali, rigidità arteriosa conseguente a fenomeni di calcificazione, ridotta angiogenesi, maggiore suscettibilità alle lesioni vascolari e lesioni aterosclerotiche (Lakatta and Levy, 2003; Herrera et al., 2010).

I meccanismi alla base dell'invecchiamento vascolare sono complessi e coinvolgono molteplici pathway (Herrera et al., 2010; . Seals et al., 2011; Toda et al., 2011). In questo contesto, la funzione vascolare dipende dal mantenimento dell'equilibrio tra produzione e biodisponibilità di ON, reso possibile dall'attività di eNOS.

3.3 ON, eNOS e longevità

ON prodotto da eNOS è un mediatore fondamentale dell'omeostasi vascolare (Moncada and Higgs, 2006). Esso è coinvolto nella

vasodilatazione, inibisce l'adesione dei leucociti, e ha effetti antitrombotici e anti-apoptotici. Diversi studi nell' uomo ed in modelli animali hanno dimostrato che la vasodilatazione mediata dall'endotelio, utilizzata come marker della funzione endoteliale, diminuisce progressivamente con l'età (Delp et al., 2008 ; Rodriguez- Manas et al., 2009). Le malattie associate all'età come l'ipertensione arteriosa, l'aterosclerosi, l'infarto e le malattie neurodegenerative hanno una disfunzione endoteliale come componente vascolare comune. L'invecchiamento vascolare è accompagnato da una ridotta espressione ed attività di eNOS o da una ridotta biodisponibilità di ON e un conseguente incremento di ROS (Radical Oxygen Species), senza che questo sia accompagnato da un potenziamento delle difese antiossidanti della cellula (Maurya et al., 2009; Raju et al., 2005; Forstermann et al, 2010).

L' ON è una molecola chiave nella longevità ed è indispensabile per un corretto funzionamento del sistema cardiovascolare. Tale concetto è stato dimostrato da diversi studi effettuati su topi che non esprimono una, una combinazione di due, o tutte le isoforme di NOS (nNOS^{-/-}; iNOS^{-/-}; eNOS^{-/-}; n/iNOSs^{-/-}; n/eNOSs^{-/-}; i/eNOSs^{-/-}; n/i/eNOSs^{-/-}). La sopravvivenza a 10 mesi dei topi NOS triplo knockout è diminuita di circa l'80%, in conseguenza a infarto spontaneo del miocardio, arterosclerosi coronarica e infiltrazione dei mastociti nella tonaca avventizia dell'arteria coronarica (Tsutsui et al., 2009). Il tasso di sopravvivenza invece, dei topi knockout solo per eNOS è ridotto del 50%.

E' stato dimostrato che la restrizione calorica aumenta la longevità. Tuttavia, questo effetto era fortemente attenuato nei topi knockout per eNOS (Nisoli et al., 2005). Questo risultato dimostra che la regolazione dell'attività di eNOS è uno dei meccanismi attraverso i quali la restrizione calorica agisce favorendo un aumento della durata della vita .

La ridotta produzione di ON può dipendere da una serie di meccanismi che comprendono: a) una riduzione dei substrati di eNOS e dei cofattori come

l'L-arginina e il BH4 (tetraidrobiopteridina); b) la presenza di inibitori endogeni di eNOS, come l'ADMA (Asymmetric DiMethylArginine) o gli analoghi dell'L-arginina presenti nel plasma ed in numerosi tessuti; c) una ridotta espressione e/o attività di eNOS. Quest'ultima a sua volta può essere dovuta ad un'alterazione del trasporto di eNOS a livello delle caveole, del suo stato di fosforilazione o dalla formazione dei dimeri (Donato et al. 2009; Rippe et al. 2010).

Tra i fattori che regolano eNOS un ruolo importante è quello di Sirt1, che modula la senescenza cellulare (Ota et al., 2007) e promuove la vasodilatazione mediata dall'endotelio indirizzando eNOS alla de-acetilazione (Mattagajasingh et al., 2007). L'espressione di Sirt1 è più bassa nelle cellule endoteliali di individui in età avanzata. Inoltre è stato dimostrato come la restrizione calorica, che ha effetti positivi sulla salute e sul processo di invecchiamento, sia in grado di indurre l'espressione di eNOS, aumentando la biogenesi mitocondriale e incrementando l'espressione di Sirt1. Ciò significa che un feedback positivo correla Sirt1 ed eNOS e l'attivazione di Sirt1 potrebbe aiutare a ripristinare un corretto funzionamento di eNOS in caso di disfunzioni endoteliali caratterizzate da una ridotta disponibilità di ON (Ota et al., 2010).

BH4 è un cofattore essenziale per eNOS; quando è presente in quantità limitanti, perché la sua biosintesi è ridotta o è aumentata la sua ossidazione, si ha il disaccoppiamento di eNOS ed il conseguente rilascio di superossido, che a sua volta porta alla degradazione di ON. La somministrazione di BH4 in soggetti anziani ha portato ad un miglioramento del vasorilassamento endoteliale dimostrando BH4 può potenzialmente portare ad un riaccoppiamento di eNOS (Higashi et al., 2006).

Un altro meccanismo che riduce la biodisponibilità di ON contribuendo all'insorgere di patologie vascolari durante l'invecchiamento è lo stress ossidativo (Donato et al., 2007). Esso è indotto principalmente da un disaccoppiamento di eNOS, un'up-regolazione dell'enzima NADPH

ossidasi o un incremento della produzione di ROS da parte dei mitocondri. In particolare un aumento dell'espressione della NADPH ossidasi è stato individuato nei vasi di pazienti anziani che non presentavano altri fattori di rischio. Inoltre, gli inibitori per la NADPH ossidasi hanno una funzione protettiva nei confronti delle disfunzioni endoteliali correlate all'invecchiamento (Rodriguez-Manas et al., 2009).

4. BPIFB4 (Dati preliminari)

Recentemente è stato condotto uno studio di associazione genome-wide (Genome-Wide Association Study, GWAS) su tre popolazioni indipendenti di individui longevi (Long-Living Individuals, LLI) reclutati per il Southern Italian Centenarian Study (Anselmi et al. 2009), il German Longevity Study (Nebel et al., 2011) ed il New England Centenarian Study (Geesaman et al., 2003) con l'obiettivo di individuare possibili SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) associati con la longevità. E' emerso così che la mutazione rs2070325 nel gene BPIFB4 (Bactericidal/Permeability-increasing Family B member 4) è associata alla longevità nei soggetti italiani (OR=2.42 e $p=0.000058$), tedeschi (OR=1.42 e $p=0.0018$) e americani (OR=1.617 e $p=0.002$). Tale mutazione, responsabile della sostituzione Ile229Val in BPIFB4, fa parte di un aplotipo costituito da quattro SNPs che comprende anche le variazioni: rs2889732 (Asn281Thr), rs11699009 (Leu488Phe) and rs11696307 (Ile494Thr). La combinazione di tali SNPs può portare alla sintesi:

- 1) di una proteina wild-type BPIFB4-WT con una frequenza del 66%; costituita da Ile229/Asn281/Leu488/Ile494;
- 2) di una Longevity Associated Variant BPIFB4-LAV con una frequenza del 29,5%; costituita da Val229/Thr281/Phe488/Thr494-BPIFB4;
- 3) di una Rare Variant BPIFB4-RV con una frequenza del 2%; costituita da Ile229/Asn281/Phe488/Thr494-BPIFB4.

BPIFB4 è una proteina N-glicosilata di 64KDa appartenente alla famiglia *Bactericidal Permeability Increasing protein* (BPI) / lipopolysaccharide-binding protein (LPB) / *palate, lung and nasal epithelium clone* (PLUNC) che comprende anche Cholesterylester Transfer Protein (CETP) e Phospholipid-transfer protein (PLTP)

Le proteine della famiglia BPI (BPIF) hanno una (BPIFA) o due (BPIFB) tasche in grado di legare i lipidi e in particolar modo la fosfatidilcolina

(Beamer et al., 1997). I membri di questa famiglia potrebbero far parte della risposta immunitaria innata, come dimostrato dalla loro rapida evoluzione tipica delle proteine coinvolte nei meccanismi di difesa, ad eccezione di BPIFB4, che è oggetto di una forte pressione selettiva (Bingle et al., 2002). L'analisi della sequenza amminoacidica (Bingle et al., 2011; Amanchy et al., 2010) ha permesso di identificare in BPIFB4 diversi possibili siti di legame come:

- ✓ eukaryotic translation initiation factor 2 alpha (eIF2 α);
- ✓ protein kinase activated by double-stranded RNA (PKR) e PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase (PERK) (amminoacido 112-119: EXSXRXXR/EGSIRDLR);
- ✓ 14.3.3 (amminoacido 119-125: RXSXXXS/RNSGYRS);
- ✓ protein kinase C-alpha, PKC- α (amminoacido 114-116: SXR/SIR)
- ✓ Glycogen synthase kinase 3 beta, GSK3 β (amminoacido 121-125: SCCCS/SGYRS)

Analisi di espressione attraverso RT-PCR, hanno permesso di identificare il trascritto corrispondente a BPIFB4 in cellule staminali embrionali di topo, nelle ghiandole salivari, nel testicolo, nella milza, nel cuore fetale (in quello adulto non è espressa la proteina), nel tessuto osseo, nel fegato, nella faringe di topo, nelle EPC (cellule progenitrici endoteliali), nelle iPS (cellule staminali pluripotenti indotte, generate da fibroblasti umani), nelle MNC (cellule mononucleate del sangue periferico). Questi risultati portano a pensare che la proteina sia attivamente trascritta in tessuti fetali, indifferenziati e altamente riproduttivi.

La struttura proteica di BPIFB4 è stata ricreata *in silico* sulla base della sua omologia con le proteine Bactericidal Permeability Increasing protein (BPI) e CEPT (Qiu et al., 2007, Kleiger et al., 2000). La struttura simili fa sì che possano essere associati a BPIFB4 anche funzionalmente (Lee HW et al., 1996) ed è ragionevole aspettarsi che BPIFB4 possa legare i

lipopolisaccaridi in regioni simili a quelle presenti nelle due proteine omologhe.

L'analisi strutturale ha rilevato che la variante Leu488Phe è localizzata in una delle tasche in grado di legare i lipidi, le cui dimensioni sembrano diminuire in seguito alla mutazione. La mutazione Ile494Thr invece si trova in una seconda tasca di legame per i lipidi della quale ne diminuisce l'idrofobicità.

Al contrario, Ile229Val e Asn281Thr si trovano in regioni deputate all'interazione proteina-proteina (Figura 7).

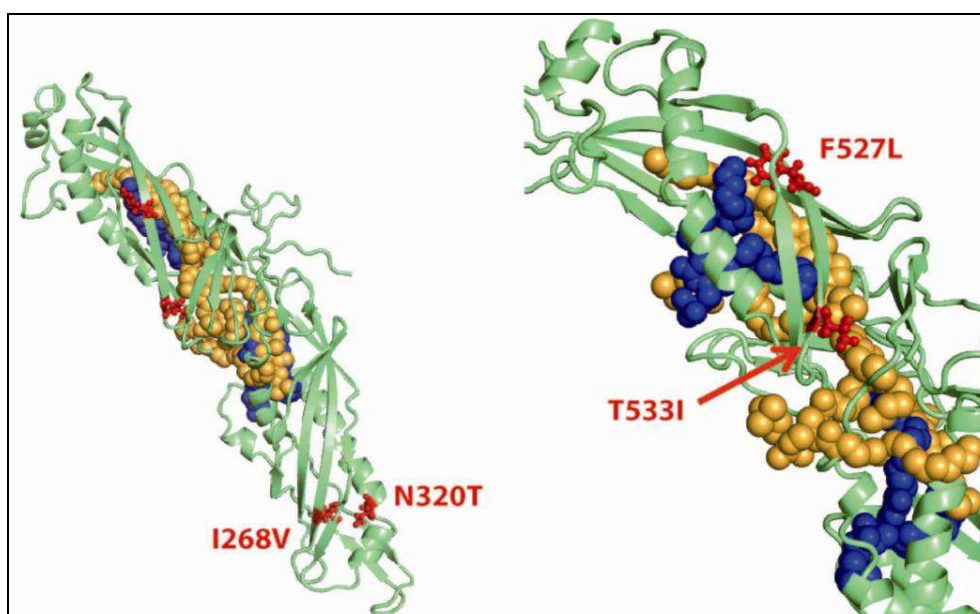


Figura 7. Conformazione teorica della struttura della proteina BPIFB4.

È stato possibile prevedere la struttura della proteina grazie all'omologia strutturale presente con la proteina Bactericidal Permeability Increasing (BPI) e cholesterylester-transfer protein (CETP). La sovrapposizione di queste strutture suggerisce la regione di BPIFB4 in cui i lipidi possono legarsi. Tali lipidi sono visualizzati come sfere blu (1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphocoline, per sovrapposizione di BPI) e sfere arancioni (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocoline and cholesteryl oleate, per sovrapposizione di CEPT). Le quattro mutazioni sono indicate in rosso. Ile 268Val e

Asn320Thr sono lontani dalle tasche in grado di legare i lipidi (sinistra). Le mutazioni Thr533Ile e Phe527Leu, situati nei siti di legame lipidico, sono mostrati nella figura a destra.

MATERIALI E METODI

1. Costrutti

Il plasmide pRK5 contenente il cDNA per hBPIFB4 e coesprimente la GFP è stato prodotto come descritto in precedenza (Andrault et al., 2003). Questo cDNA codifica per una proteina di 575 amminoacidi (ID: P59827.2) (Bingle et al., 2011) corrispondente alla variante RV, la forma WT e LAV sono state generate attraverso mutagenesi sito diretta (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies).

Per ottenere l'isoforma WT, è stata effettuata una doppia sostituzione nucleotidica ricavando così le variazioni amminoacidiche: Leu488Phe (fw:GACGTGGACACAGAACTCTTGGCCTCATTTTC, rev:GAAAATGAGGCCAAGAGTTCTGTGTCCACGTC) Ile494Thr (fw:CTTGGCCTCATTTTCCATAGAAGGAGATAAGCTC, rev:GAGCTTATCTCCTTCTATGGAAAATGAGGCCAAG). Per ottenere l'isoforma LAV è stata effettuata una doppia sostituzione nucleotidica ricavando così le variazioni amminoacidiche: Ile229Val (fw:AGTCTTATTGGCTTCCTGGACGTCGCAGTAGAAGTGAACATCA, rev:TGATGTTCACTTCTACTGCGACGTCCAGGAAGCCAATAAGACT) e Asn281Thr (fw:ATCTCGTGGACAATTTAGTGACCCGAGTCCTGGCCGACGTCCT, rev:AGGACGTCGGCCAGGACTCGGGTCACTAAATTGTCCACGAGAT). Tutti i costrutti sono stati sequenziati per il gene BPIFB4.

2. Western blotting

I lisati proteici dei campioni cellulari e dei vasi trasfettati e perfusi in pool (7 per ogni esperimento) sono stati risolti in SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 10% o 4-12%, sottoposti a blotting su membrane PVDF, bloccati con latte al 5% e ibridati overnight con i seguenti anticorpi: anti-

phospho-eNOS Ser1177 (Cell Signaling Technology, rabbit mAb, 1:1000), anti-eNOS (Cell Signaling Technology, mouse mAb 1:800), anti-BPIFB4 (Abcam, rabbit polyclonal Ab, 1:200), anti- β actina (Cell Signaling Technology, mouse mAb, 1:3000), anti-PKC α phospho-T497 (Abcam, rabbit mAb 1:10000), anti-PKC α (Abcam, rabbit mAb, 1:1000), anti-SIRT1 phospho-S47 (ImmunoWay Biotechnology, rabbit polyclonal Ab, 1:500) and anti-SIRT1 (Biorbyt, rabbit polyclonal Ab, 1:200). Le membrane sono state lavate tre volte con TBS-Tween20 0.1%, ibridate con gli anticorpi secondari coniugati all'HRP (Amersham Life Science) ed infine le proteine di interesse sono state rivelate mediante il sistema ECL (Amersham Life Science). I livelli d'espressione delle proteine sono stati valutati previa normalizzazione per la β actina, effettuando l'analisi densitometrica delle bande attraverso il *software* ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

3. Trasfezione ex vivo dei vasi murini e valutazione della reattività muscolare

Arterie mesenteriche corrispondenti alla seconda branca sono state prelevate da topi C57BL6 e trasfettate come già descritto in precedenza (Vecchione et al., 2005). I vasi, 7 per ogni punto dell'esperimento, vengono posti in un miografo di Mulvany e perfusi con la soluzione di Krebs alla quale vengono aggiunti 20 μ g del vettore pRK5 codificante per BPIFB4 WT, LAV, RV o del plasmide vuoto usato come controllo. Alcuni vasi sono stati trasfettati con il siRNA per BPIFB4 o con un controllo siRNA scrambled. Tutti i vasi sono stati perfusi a 100mmHg per 1h e poi a 60mmHg per 5h. La vasocostrizione viene indotta con KCl 80mM e con dosi crescenti di fenilefrina (da 10⁻⁹ M a 10⁻⁶ M) o del trombossano-mimetico U46619 (da 10⁻¹¹ M a 10⁻⁶ M) e riportata come percentuale di variazione del diametro del lume vasale dopo trattamento. La vasodilatazione, dipendente o

indipendente dall'endotelio, è stata valutata di contro, misurando la risposta a dosi crescenti rispettivamente di acetilcolina e nitroglicerina (da 10^{-9} M a 10^{-5} M) dei vasi pre-contratti con una dose di U46619 tale da avere un livello di contrazione uguale per ogni esperimento (80% della contrazione iniziale evocata dal KCl). La massima contrazione indotta da U46619 viene considerata come base per la successiva induzione della vasodilatazione. La risposta vascolare è stata testata prima e dopo la trasfezione. La vasodilatazione indotta da acetilcolina è stata testata anche in presenza di Gö6976 (1 μ M), un inibitore di PKC α . Alcuni esperimenti sono stati effettuati su vasi prelevati da topi knockout in eterozigosi per *Mthfr* e dai relativi controlli.

RISULTATI

Il possibile ruolo di BPIFB4 è stato indagato in un sistema *ex vivo* di arteria mesenterica di topo (un vaso di resistenza coinvolto nella modulazione della pressione sanguigna). Tramite l'incremento della pressione all'interno del vaso, è stato provocato uno stress biomeccanico, che ha portato ad un aumento dell'espressione della proteina BPIFB4 endogena rilevata nei lisati totali delle arterie utilizzate per l'analisi (Figura 8).

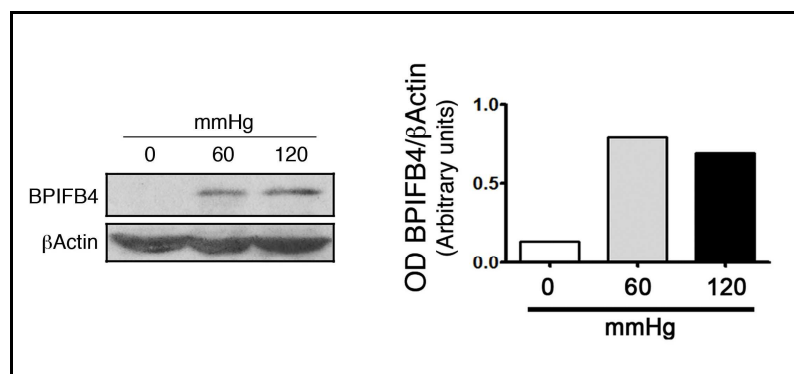


Figura 8. Espressione di BPIFB4 in arterie mesenteriche di topo perfuse. Espressione della proteina BPIFB4 nell'arteria mesenterica di topo perfusa con incrementati livelli di pressione. L'istogramma a destra mostra i livelli della proteina normalizzati rispetto alla β-actina, ottenuti tramite l'analisi densitometrica delle bande corrispondenti.

I vasi sono stati poi trasfettati per perfusione con un siRNA in grado di inibire in maniera specifica l'espressione di BPIFB4 e ne è stata valutata la risposta ad una serie di sostanze in grado di indurre vasocostrizione o vasodilatazione. In particolare il K^+ determina la depolarizzazione della membrana delle cellule muscolari e un conseguente ingresso di Ca^{2+} dall'esterno che porta quindi alla contrazione.

La fenilefrina (PE) è un agonista selettivo dei recettori $\alpha 1$ -adrenergici accoppiati alle proteine G che determina vasocostrizione. La proteina G

eterotrimerica determina un'attivazione della fosfolipasi C responsabile dell'idrolisi del fosfatidil-inositolo-4,5-difosfato (PIP₂) di membrana, e della conseguente formazione di inositolo-trifosfato (IP₃) che interagendo con i canali del Ca²⁺ del reticolo endoplasmatico ne causa il rilascio.

U46619, un mimetico sintetico dei trombossano A₂ (TXA₂), determina una vasocostrizione mediata da un incremento relativamente basso di Ca²⁺. Lo stato di fosforilazione della miosina infatti, può essere regolato da meccanismi sia Ca²⁺-dipendenti (mediati dalla chinasi della catena leggera della miosina: "myosin light chain kinase", MLCK) che Ca²⁺-indipendenti (mediati da Rho-chinasi). L'interazione del trombossano con il proprio recettore di superficie attiva RhoA che lega GTP e trasloca a livello della membrana. Il suo effettore, la Rho-chinasi (una serina-treonina chinasi), fosforila e inattiva la fosfatasi della catena leggera della miosina (MLCP) quest'ultima può essere così fosforilata da MLCK, determinando la contrazione delle cellule muscolari.

La vasodilatazione mediata dall'acetilcolina invece è dovuta all'azione combinata di una serie di fattori tra cui eNOS, le prostaglandine e l'EDHF.

L'inibizione di BPIFB4 tramite siRNA determina una riduzione della vasocostrizione in seguito a somministrazione di KCl e fenilefrina ed una ridotta vasodilatazione dopo il trattamento con acetilcolina rispetto alla risposta del vaso prima della trasfezione o in seguito alla perfusione con il siRNA scramble. Non si osserva invece, nessuna variazione della risposta indotta da U46619 (Figura 9). Questo dimostra chiaramente che BPIFB4 è coinvolta nell'omeostasi vascolare.

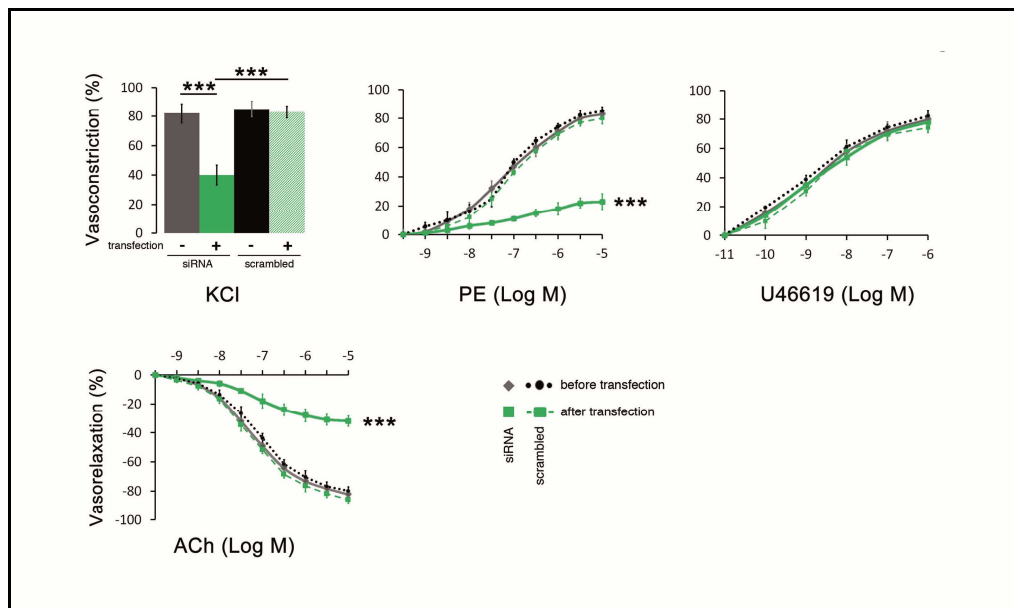


Figura 9. Effetti della inibizione di BPIFB4 tramite siRNA sulla reattività vascolare in arterie mesenteriche di topo. Risposta vascolare al potassio (80mM KCl) e a dosi crescenti di fenilefrina (PE), di U46619 e di acetilcolina (ACh), prima (● -) e dopo (■ +) la trasfezione con il siRNA per BPIFB4 (●● +) o siRNA scramble (■ -). I valori indicati rappresentano la media, con la corrispondente deviazione standard, di n=7 esperimenti per gruppo. Con gli asterischi (***) viene indicato un $P < 0.001$.

A questo punto abbiamo deciso di trasfettare per perfusione nei vasi i plasmidi codificanti per la proteina BPIFB4-WT, -RV o -LAV fusa con la green fluorescent protein (GFP). L'efficienza di trasfezione, valutata grazie alla presenza della GFP, è risultata essere maggiore dell'80% (Figura 10).

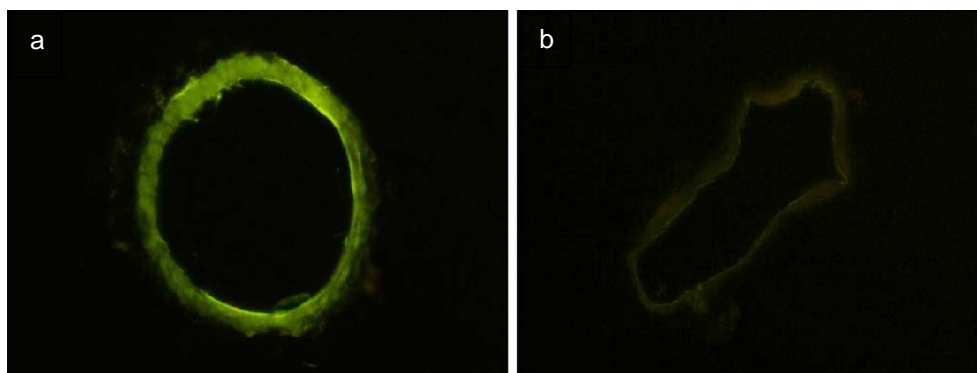


Figura 10. Trasfezione ex vivo dei vasi perfusi con i plasmidi codificanti per BPIFB4.

a. Arteria mesenterica di topo C57BL/6 trasfettato con il plasmide codificante per la proteina BPIFB4 fusa con la GFP. **b.** Esperimento di controllo: vaso trasfettato con il plasmide senza GFP. Per misurare l'intensità di fluorescenza, in termini di pixels per unità di area, è stato usato il software ImageJ; il valore ottenuto è la percentuale d'intensità della GFP comparata all'esperimento controllo.

E' così emerso come in seguito all'overespressione di BPIFB4-WT il vaso non altera in alcun modo la sua risposta sia agli stimoli di contrazione che di rilassamento, misurati prima della trasfezione. L'espressione di BPIFB4-LAV invece determina un aumento della vasodilatazione in seguito al trattamento con acetilcolina ed una riduzione della vasocostrizione indotta da KCl e fenilefrina, ma non da U46619. I vasi trasfettati con il costrutto codificante per BPIFB4-RV presentano una risposta simile a quella che si ottiene inibendo la produzione di BPIFB4 con il siRNA: una ridotta vasocostrizione dopo la somministrazione di KCl e di fenilefrina ed una mancata dilatazione indotta da acetilcolina (Figura 11).

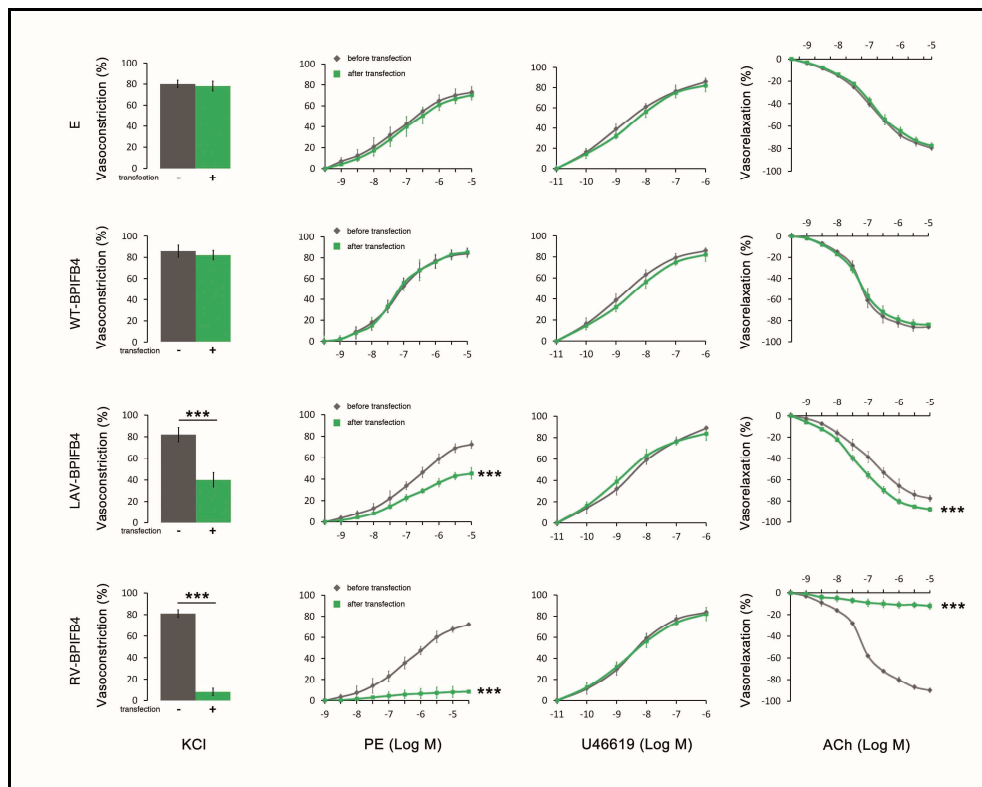


Figura 11. Effetti di BPIFB4 e delle sue isoforme sulla reattività vascolare in arterie mesenteriche di topo. Risposta vascolare al potassio (80mM KCl) e a dosi crescenti di fenilefrina (PE), di U46619 e di acetilcolina (ACh), prima (◊ -) e dopo (■ +) la trasfezione con BPIFB4-WT, -LAV, -RV o con il vettore empty di controllo. L'esperimento è stato eseguito ex vivo su arterie mesenteriche di topi C57BL/6. I valori indicati rappresentano la media, con la corrispondente deviazione standard, di n=7 esperimenti per gruppo.

Il vasorilassamento evocato dall'acetilcolina nei vasi di resistenza può dipendere dall'azione di una serie di mediatori tra cui eNOS, i prostanoidei e l'EDHF. L'effetto di ognuno di questi elementi si riduce quando un altro è presente in maggiore quantità (Sekiguchi F et al., 2002). Sulla base di queste osservazioni, per verificare se l'aumento della vasodilatazione, ottenuta nelle arterie mesenteriche che esprimono la proteina BPIFB4-LAV, è effettivamente dovuta ad una maggiore produzione di ossido nitrico da

parte di eNOS, quest'ultima è stata inibita, in maniera specifica, con N^G-nitro-L-arginina metile estere (L-NAME) (Figura12).

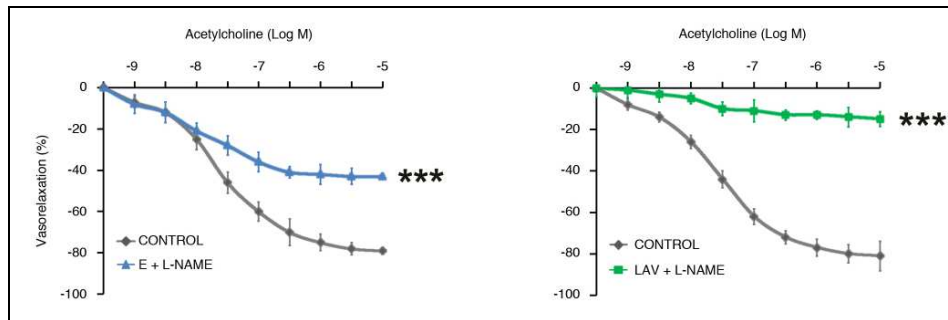


Figura 12. Inibizione della vasodilatazione da parte di L-NAME in vasi trasfettati con il costrutto BPIFB4-LAV. Curva della risposta vascolare a dosi crescenti di acetilcolina di arterie mesenteriche di topi C57BL/6 (ex vivo) trasfettate con il vettore empty (grafico a sinistra) o codificante BPIFB4-LAV (grafico a destra), prima e dopo il trattamento con l'inibitore di eNOS, L-NAME (300μM). Nei vasi che esprimono BPIFB4-LAV l'effetto di L-NAME sull'inibizione della vasodilatazione è più pronunciato. I valori indicati rappresentano la media, con la corrispondente deviazione standard, di n=7 esperimenti per gruppo. Student's t-test: ***, P<0.001.

L'esperimento in presenza dell'inibitore si è osservata una riduzione più pronunciata del vasorilassamento causato da acetilcolina, nei vasi trasfettati con BPIFB4-LAV rispetto a quelli trasfettati con il vettore empty (Figura 12). Questi risultati potrebbero essere spiegati attraverso una maggiore concentrazione di ON che riduce la disponibilità degli altri mediatori responsabili della vasodilatazione indotta da acetilcolina. L-NAME è anche in grado di ripristinare, seppur in parte, la riduzione della contrazione in seguito al trattamento con KCl e fenilefrina (Figura 13).

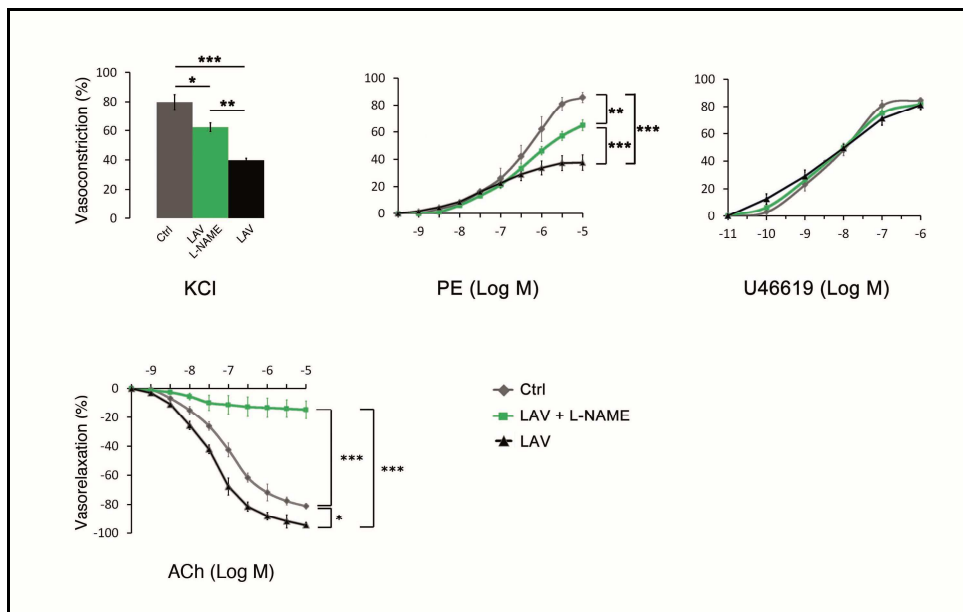


Figura 13. Effetto dell'inibitore di ossido nitrico L-NAME sulla reattività dei vasi trasfettati con BPIFB4-LAV. Risposta vascolare al potassio (80mM KCl) e a dosi crescenti di fenilefrina (PE), di U46619 e di acetilcolina (ACh), prima (◆) e dopo la trasfezione con BPIFB4-LAV (▲) o BPIFB4-LAV + L-NAME (■). I valori riportati rappresentano la media, con la corrispondente deviazione standard, di n=7 esperimenti per gruppo. Student's t-test: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001

E' stata poi valutata la presenza della proteina eNOS totale e fosforilata nel pool dei vasi trasfettati (sette per ogni condizione). La fosforilazione di eNOS sulla serina 1177 (p-eNOS^{S1177}), che in vivo è mediata dalle chinasi Akt, PKA e AMPK, è necessaria affinché l'enzima sia attivo. Ciò che emerge è che l'espressione di BPIFB4-LAV determina un aumento della fosforilazione di eNOS, mentre essa si riduce fortemente nel BPIFB4-RV e in seguito al trattamento con il siRNA, rispetto al BPIFB4-WT, ma anche rispetto ai controlli Empty e siRNA scrambled (Figura 14).

E' stato dimostrato che la vasodilatazione di arterie mesenteriche isolate, indotta da acetilcolina, richiede l'attività della chinasi PKCα (Adapala RK et al. 2011). Per tale ragione è stata verificata la presenza della forma

fosforilata, sulla treonina 497 (p-PKC α^{T497}), e attiva della chinasi nel pool dei vasi trasfettati. Essa segue un profilo del tutto simile a quello di p-eNOS^{S1177} : PKC α è maggiormente fosforilata nei vasi trasfettati con BPIFB4-LAV, mentre lo è molto meno in quelli che esprimono BPIFB4-RV (Figura 14).

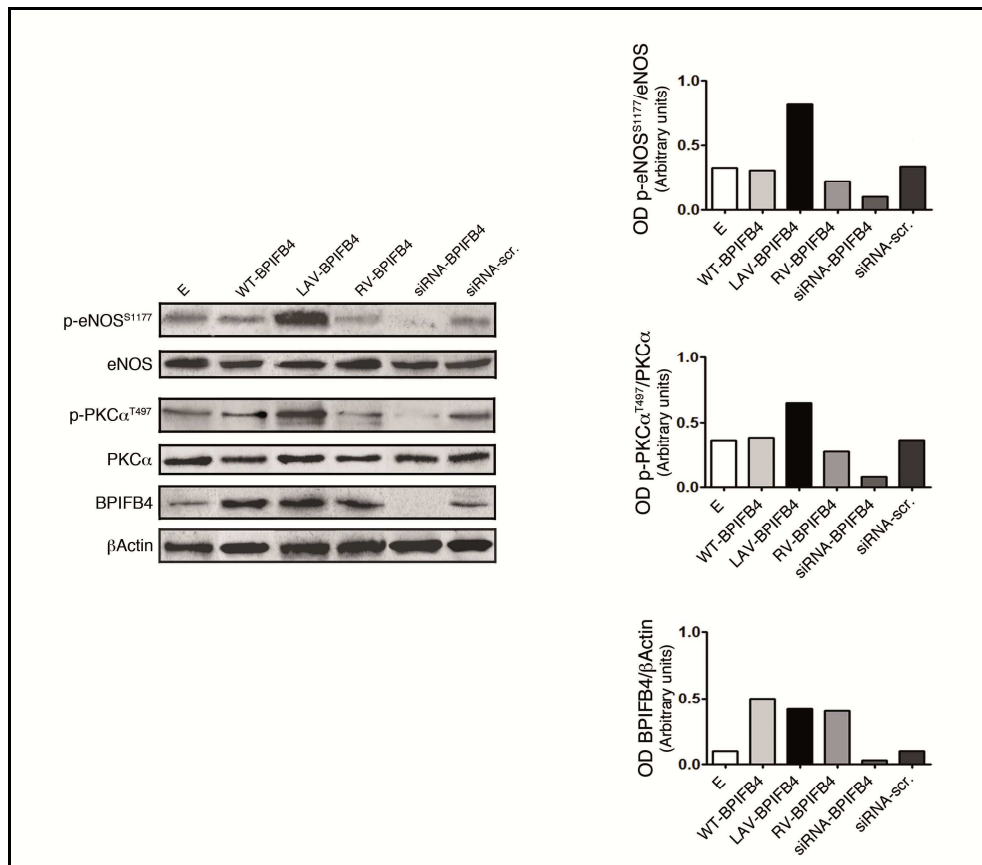


Figura 14. Effetti delle varianti di BPIFB4 sulla fosforilazione di eNOS e PKC α . Analisi Western blot di 7 esperimenti in pool su arterie mesenteriche di topo trasfettate con: un plasmide vuoto (E), codificante per BPIFB4-WT, per BPIFB4-LAV, o per BPIFB4-RV un siRNA specifico per BPIFB4 o uno scrambled siRNA. La membrana è stata ibridata con gli anticorpi specifici contro eNOS fosforilato sulla S1177 (p-eNOS^{S1177}), PKC α fosforilato sulla treonina 497 (p-PKC α^{T497}), eNOS totale (eNOS), PKC α

totale (PKC α), BPIFB4 e la β -actina. Gli istogrammi a destra mostrano i livelli delle proteine p-eNOS^{S1177} e p-PKC α ^{T497} normalizzate sulle corrispettive proteine totali eNOS e PKC α , ed i livelli di BPIFB4 normalizzati rispetto all'housekeeping β -actina.

Per ottenere un'ulteriore conferma che tali effetti siano mediati da PKC α , le arterie mesenteriche di topo sono state trattate con Gö6976, un inibitore di PKC α . Esso determina una riduzione della vasodilatazione indotta da acetilcolina nei vasi non trasfettati e annulla l'aumento della vasodilatazione determinata dall'espressione nel vaso di BPIFB4-LAV (Figura 15a.). In quest'ultimo infatti, in seguito al trattamento con Gö6976, vi è una drastica riduzione dei livelli di p-eNOS^{S1177} e, come ci si aspettava, della forma attiva dell'enzima PKC α , p-PKC α ^{T497}.

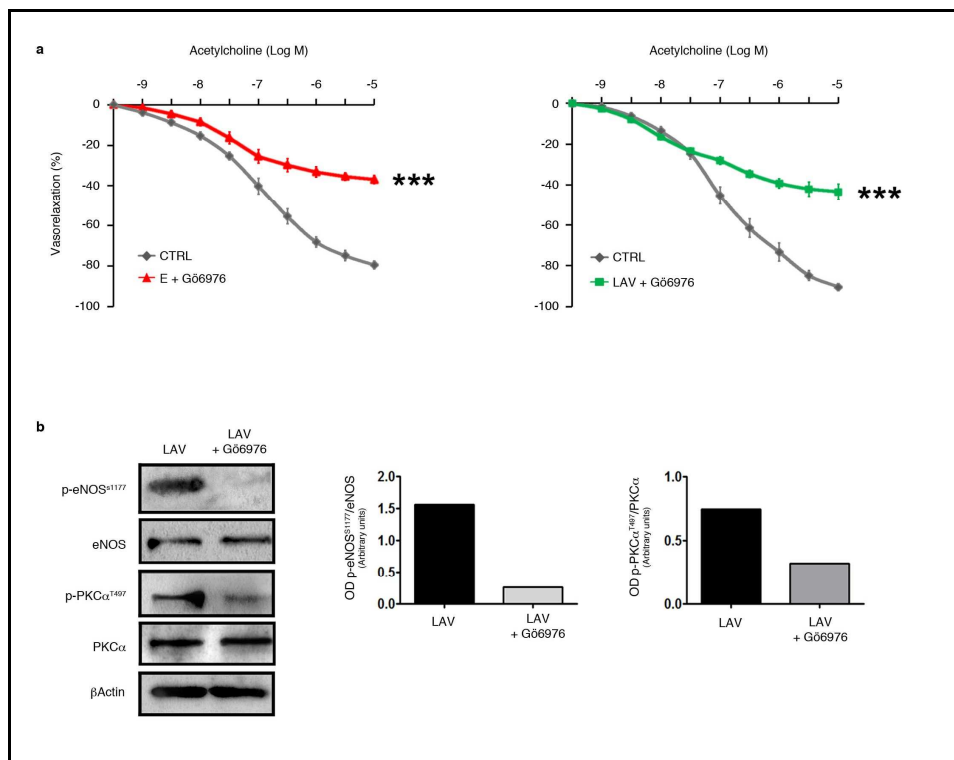


Figura 15. Inibizione della vasodilatazione da parte di Gö6976 in vasi trasfettati con il costrutto BPIFB4-LAV. **a.** Curva della risposta vascolare, a dosi crescenti di acetilcolina, di arterie mesenteriche di topi C57BL/6 (ex vivo) prima e dopo il trattamento con Gö6976 (1 μ M), un inibitore di PKC α (grafico a sinistra), e prima o dopo la trasfezione con il vettore codificante per BPIFB4-LAV (grafico a destra). I valori indicati rappresentano la media, con la corrispondente deviazione standard, di n=7 esperimenti per gruppo. Student's t-test: ***, $P<0.001$. **b.** Western blot di 7 esperimenti in pool su arterie mesenteriche di topo trasfettate con il costrutto codificante per BPIFB4-LAV in presenza o in assenza di Gö6976. Gli istogrammi a destra mostrano i livelli delle proteine p-eNOS^{S1177} e p-PKC α ^{T497} normalizzate sulle corrispondenti proteine totali eNOS e PKC α .

E' stato poi valutato l'impatto di BPIFB4-LAV su un modello di topo con un'alterata attività di eNOS. Per fare ciò sono state utilizzate arterie mesenteriche di topi knockout in eterozigosi per l'enzima Metilentetraidrofolato riduttasi (*Mthfr*), caratterizzati anche da una down-regolazione del fattore di longevità SIRT1.

La vasodilatazione indotta da acetilcolina è fortemente ridotta nei topi *Mthfr*^{+/-} rispetto ai topi *Mthfr*^{+/+}, ma in seguito a trasfezione con il plasmide codificante per LAV, essa torna ad essere paragonabile a quella dei vasi usati come controllo. Si ha inoltre un aumento di eNOS, mentre non si osserva nessuna modulazione di SIRT1 (Figura 16).

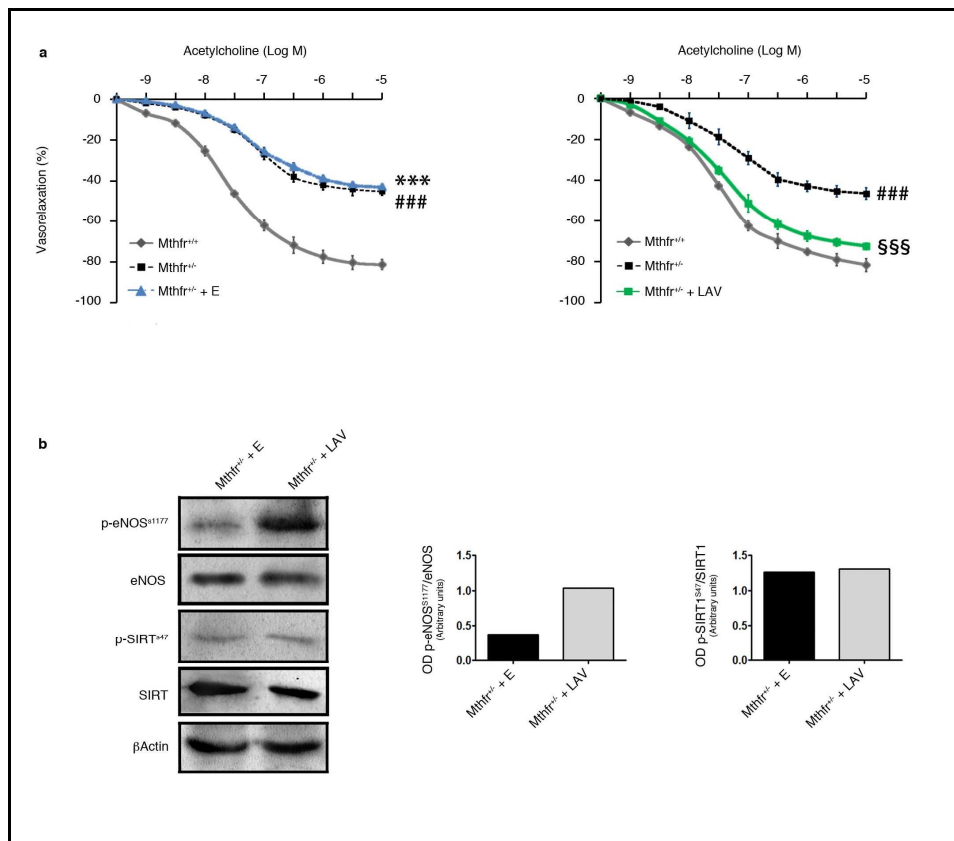


Figura 16. Effetto di BPIFB4-LAV sulla vasodilatazione in topi $Mthfr^{+/-}$.
a. Curve della risposta vascolare, a dosi crescenti di acetilcolina, di arterie mesenteriche di topi (ex vivo): a sinistra, $Mthfr^{+/+}$, $Mthfr^{-/-}$ (knockout in eterozigosi per $Mthfr$) e $Mthfr^{+/-}$ trasfettate con il plasmide vuoto (Empty, E); a destra, $Mthfr^{+/+}$, $Mthfr^{-/-}$ e $Mthfr^{+/-}$ trasfettate con BPIFB4-LAV. I valori indicati rappresentano la media, con la corrispondente deviazione standard, di $n=7$ esperimenti per gruppo. #### $P<0.001$ tra $Mthfr^{+/+}$ e $Mthfr^{+/-}$; *** $P<0.001$ tra $Mthfr^{+/+}$ e $Mthfr^{+/-} + E$; §§§ $P<0.001$ tra $Mthfr^{+/-}$ e $Mthfr^{+/-} + BPIFB4-LAV$. **b.** Western blot di 7 esperimenti in pool su arterie mesenteriche di topo $Mthfr^{+/-}$ trasfettate con il costrutto codificante per BPIFB4-LAV o con il plasmide vuoto E. Gli istogrammi a destra mostrano le quantificazioni di p-eNOS^{S1177} e p-SIRT1^{S47} normalizzate sulle corrispettive proteine totali eNOS e SIRT1.

DISCUSSIONE

L'invecchiamento viene considerato un processo complesso e multifattoriale regolato da interazioni stocastiche (danno casuale a molecole essenziali per la vita), interventi esterni (dieta e/o restrizione calorica) e alterazioni intrinseche (variazioni genetiche). Negli ultimi decenni è aumentata l'attenzione su quest'ultimo aspetto, promuovendo la ricerca di variazioni genetiche associate a caratteristiche protettive rispetto a patologie tipiche della vecchiaia, quali ipertensione, diabete e cancro. Di fatto i longevi (individui che approcciano i cento anni) sono una popolazione selezionata, che presenta una prevalenza molto bassa delle malattie tipiche dell'anziano ed una capacità superiore alla media di sopravvivere ad esse in età avanzata. Potrebbero quindi rappresentare un buon modello per studiare lo sviluppo di tale patologie.

Numerosi geni sono stati identificati come possibili candidati ad essere associati al fenotipo longevo ma, ad eccezione del gene *APOE*, nessuno di essi è stato riconfermato in popolazioni indipendenti. Nei modelli animali, i geni implicati nel processo di invecchiamento, in base al fatto che eventi di mutazione in essi causano modifiche nella lunghezza della vita, sono coinvolti in due *pathways* principali: il metabolismo dell'insulina, che richiede il gene *IGF-1* e la risposta ai danni ossidativi, che coinvolge il gene *SIRT1*.

eNOS rappresenta il link tra la restrizione calorica e il ritardo nel processo di invecchiamento attraverso l'attivazione di AMPK, la biogenesi mitocondriale e la proteina sirtuin 1 (Lemarie et al. 2011). Gli effetti della restrizione calorica possono essere spiegati attraverso un'augmentata efficienza dell' IGF1-insulin signaling (IIS) infatti, gli studi su pazienti con deficienza nel recettore per l'ormone della crescita suggeriscono che potrebbe essere proprio l'aumentata sensibilità all'insulina a spiegare l'assenza di diabete e la bassa incidenza di tumore in questi individui

(Guevara-Aguirre et al. 2011). Inoltre, la restrizione calorica può essere mimata bloccando l'IIS agendo ad esempio lungo l'asse IGF1/PI3K/AKT/FOXO3A. Ed è proprio via AKT che IIS controlla eNOS ed esercita la sua azione sulla longevità.

L'attivazione di eNOS è importante in diversi processi fisiologici e un suo non corretto funzionamento è dannoso in molte patologie (Huang. 2009). In particolare l'ossido nitrico gioca un ruolo importante nella modulazione del tono vascolare e quindi, nella regolazione della pressione arteriosa (Tsikas et al. 2012). Nella maggior parte della popolazione, con l'avanzare dell'età, si osserva una significativa riduzione della biodisponibilità di ossido nitrico, che porta ad un'alterazione delle funzioni dell'endotelio vascolare e dell'omeostasi vascolare (Raju et al. 2005).

Studi *genome-wide* hanno evidenziato che la mutazione rs2070325 corrispondente alla sostituzione Ile229Val nel gene BPIFB4, è arricchita nei soggetti longevi reclutati in Italia, in Germania e in USA. Un'analisi più attenta del locus BPIFB4 ha permesso di indentificare la variazione rs2070325 come parte di un aplotipo costituito da quattro SNPs che può portare alla sintesi di una proteina wild-type-WT (66%; Ile229/Asn281/Leu488/Ile494-BPIFB4), una Longevity Associated Variant-LAV (29,5%; Val229/Thr281/Phe488/Thr494-BPIFB4) e una Rare Variant-RV (2%; Ile229/Asn281/Phe488/Thr494-BPIFB4).

L'incremento dei livelli di pressione arteriosa è comunemente dovuto ad un aumento della gittata sistolica e/o delle resistenze vascolari. I vasi di resistenza prossimale, come l'arteria mesenterica, influenzano notevolmente la resistenza periferica. Abbiamo perciò deciso di indagare il possibile ruolo di BPIFB4 in un sistema *ex vivo* di arteria mesenterica di topo. E' emerso che la nostra proteina è effettivamente presente nelle pareti arteriose anche se in basse quantità. Una sua maggiore espressione è indotta invece in condizioni di stress, come è stato verificato incrementando la pressione all'interno del vaso (Figura 8). Inoltre, la sua

inibizione tramite siRNA causa un danno rilevante alle funzioni vascolari: il vaso non è più in grado di rispondere efficacemente agli stimoli di vasocostrizione e di vasodilatazione. L'inibizione di BPIFB4 determina infatti una marcata riduzione della costrizione arteriosa che si ha in seguito a stimolazione adrenergica (ottenuta tramite la perfusione di fenilefrina) ed alla somministrazione di potassio, rispetto ai vasi utilizzati come controllo. Anche la dilatazione del vaso indotta dal trattamento con acetilcolina è estremamente ridotta, mentre non si osserva nessuna variazione nella risposta al composto U46619, un trombossano sintetico che determina vasocostrizione in presenza di basse concentrazioni di Ca^{2+} . Tutto ciò dimostra chiaramente che BPIFB4 è una proteina essenziale nella modulazione del tono vascolare (Figura 9).

A questo punto abbiamo deciso di investigare l'impatto delle varie isoforme della proteina sulla reattività vascolare trasfettando nei vasi i plasmidi codificanti per BPIFB4-WT, -RIV o -LAV, ognuna fusa con la GFP. Una volta appurata l'effettiva espressione della proteina, grazie all'emissione di fluorescenza (Figura 10), i vasi sono stati sottoposti a vari stimoli di vasocostrizione e di vasodilatazione.

E' così emerso come l'overespressione di BPIFB4-WT non altera in alcun modo la funzionalità vascolare (Figura 11), mentre, l'espressione di BPIFB4-LAV è in grado di potenziare la vasodilatazione determinata da acetilcolina e di ridurre parzialmente la vasocostrizione indotta da KCl e fenilefrina, ma non da U46619.

Il vasorilassamento evocato dall'acetilcolina nei vasi di resistenza può dipendere dall'azione di una serie di mediatori tra cui l'ON, le prostaglandine e l'endothelium-derived-hyperpolarizing factor (EDHF). L'acetilcolina infatti determina un aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} , indispensabile per l'attivazione di eNOS e della ciclossigenasi (COX) (responsabili rispettivamente della produzione di ON e delle prostaglandine) ma anche per la formazione ed il rilascio di EDHF.

L'effetto di ognuno di questi elementi si riduce quando un altro è presente in maggiore quantità (Sekiguchi F et al., 2002).

Sulla base di tali osservazioni, è risultato indispensabile dimostrare che l'incremento della vasodilatazione, dopo il trattamento con acetilcolina, ottenuta nelle arterie mesenteriche di topo esprimenti la proteina BPIFB4-LAV, fosse effettivamente dovuta ad una maggiore produzione di ossido nitrico. Per fare ciò eNOS è stata inibita, in maniera specifica, con l' N^G-nitro-L-arginina metile estere (L-NAME) (Figura 12 e 13), che compete efficacemente con l'L-arginina, impedendo all'enzima di catalizzare la produzione di ossido nitrico. Essa è in grado di ridurre notevolmente la vasodilatazione indotta dall'acetilcolina in arterie mesenteriche di topo. Nei vasi trasfettati con BPIFB4-LAV tale riduzione è molto più pronunciata se confrontata a quella che si ha nei trasfettati con il vettore empty. Ciò potrebbe essere spiegato ipotizzando che l'espressione di BPIFB4-LAV porti ad una maggiore concentrazione di ON nelle cellule endoteliali, che riduce la presenza degli altri mediatori (prostaglandine ed EDHF) coinvolti nella vasodilatazione indotta da acetilcolina.

L-NAME è anche in grado di ripristinare, seppur in parte, la riduzione della contrazione che si osserva nei vasi esprimenti BPIFB4-LAV in seguito al trattamento con KCl e fenilefrina (Figura 13).

A sua volta una maggiore presenza di ON nella cellula può essere determinata da una maggiore attività dell'enzima deputato alla sua sintesi. Affinché eNOS sia attivo è necessario che esso sia fosforilato sulla serina 1177 (p-eNOS^{S1177}). Nel lisato totale dei vasi utilizzati per l'analisi è stata individuata una maggiore presenza di p-eNOS^{S1177} proprio nel caso dei campioni che esprimono BPIFB4-LAV, mentre essa si riduce fortemente nei vasi trattati con il siRNA rispetto a quelli trattati con BPIFB4-WT o con il plasmide vuoto (Figura 14).

Inoltre perché eNOS venga attivato è necessario sia il rilascio del Ca²⁺ dalle riserve intracellulari del reticolo endoplasmatico (RE), sia l'ingresso di

esso attraverso i canali cationici presenti sulla membrana plasmatica. L'influsso di Ca^{2+} dallo spazio extracellulare contribuisce a sostenere l'incremento della concentrazione citosolica. In particolare l'interazione dell'acetilcolina con il recettore muscarinico endoteliale M3 determina l'attivazione della fosfolipasi C che catalizza la formazione di IP_3 e DAG a partire dal fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato. L' IP_3 interagendo con i recettori specifici determina il rilascio di Ca^{2+} dal RE. Inoltre l'acetilcolina è in grado di aumentare l'influsso di Ca^{2+} dall'esterno della cellula attivando i canali Transient Receptor Potential Vanilloid type4 (TRPV4) e per farlo necessita dell'attività della chinasi $\text{PKC}\alpha$ (Adapala RK et al. 2011). Inoltre, al contrario delle altre isoforme di PKC che inibiscono l'attività di eNOS fosforilandola sul sito inibitorio T^{495} , è stato dimostrato che $\text{PKC}\alpha$ invece, aumenta la fosforilazione sulla S^{1177} favorendone l'attivazione (Chohreh et al. 2005). Per tale ragione è stata verificata la presenza della forma fosforilata, e attiva di $\text{PKC}\alpha$ ($\text{p-PKC}\alpha^{\text{T}^{497}}$) nel pool di vasi trasfettati. $\text{p-PKC}\alpha^{\text{T}^{497}}$, esattamente come $\text{p-eNOS}^{\text{S}^{1177}}$, è presente in maggior quantità nei vasi che esprimono BPIFB4-LAV, mentre lo è molto meno in quelli con BPIFB4-WT e quasi scompare in quelli trasfettati con il siRNA (Figura 14).

Per avere un'ulteriore conferma che gli effetti osservati siano mediati da $\text{PKC}\alpha$, l'esperimento è stato ripetuto trattando le arterie mesenteriche di topo con Gö6976, un inibitore di $\text{PKC}\alpha$. Esso causa, come ci si aspettava, una riduzione della vasodilatazione indotta da acetilcolina nei vasi non trasfettati. Nei vasi con BPIFB4-LAV invece, annulla l'incremento nella vasodilatazione che lo caratterizza. In quest'ultimo infatti, in seguito al trattamento con Gö6976, oltre ad esserci una riduzione della forma attiva dell'enzima $\text{PKC}\alpha$, $\text{p-PKC}\alpha^{\text{T}^{497}}$ vi è una drastica riduzione anche dei livelli di $\text{p-eNOS}^{\text{S}^{1177}}$ (Figura 15).

Tutto ciò conferma che la maggiore attività dell'enzima eNOS, con una conseguente maggiore produzione di ON, che a sua volta potenzia la

capacità dilatatoria dei vasi che esprimono l'isoforma BPIFB4-LAV è mediata dalla chinasi PKC α .

Abbiamo quindi deciso di valutare la possibilità di utilizzare BPIFB4-LAV per trattare le disfunzioni endoteliali causate da un'alterata attività di eNOS. Per fare ciò sono state utilizzate arterie mesenteriche di topi knockout in eterozigosi per l'enzima Metilentetraidrofolato reduttasi (*Mthfr*), un modello di topo caratterizzato da disfunzioni nella produzione di ossido nitrico associate alla downregolazione di sirtuin1 (Lemarie et al. 2011). Sirt-1 è un fattore associato alla longevità che modula la senescenza cellulare (Ota et al. 2007) e promuove la vasodilatazione dipendente dall'endotelio favorendo la deacetilazione di eNOS (Mattagajasingh et al. 2007). Nell'uomo, la parziale alterazione della funzionalità della MTHFR è largamente diffusa in molte popolazioni ed è associata ad un incremento del rischio di sviluppare numerose patologie. Come previsto, la vasodilatazione in seguito alla somministrazione di acetilcolina è fortemente ridotta nei topi *Mthfr*^{+/-} rispetto ai topi *Mthfr*^{+/+}, ma nel caso dei vasi trasfettati con BPIFB4-LAV, essa torna ad essere paragonabile a quella dei topi *Mthfr*^{+/+} ed è inoltre accompagnata da uno switch-on di eNOS fosforilato. Non si osserva invece nessuna modulazione di SIRT1 (Figura 16).

Per quanto riguarda invece i vasi trasfettati con il costrutto codificante per BPIFB4-RV, essi manifestano un'alterazione delle funzioni endoteliali simile a quella che si ottiene inibendo la produzione di BPIFB4 con il siRNA: una forte riduzione della vasocostrizione dopo la somministrazione di KCl e di fenilefrina ed una mancata dilatazione indotta da acetilcolina, mentre non si osservano variazioni nella capacità del vaso di contrarsi in seguito al trattamento con U46619 (Figura 11). Al contrario di ciò che avviene per BPIFB4-LAV i vasi con BPIFB4-RV presentano livelli più bassi di p-eNOS^{S1177} e p-PKC α ^{T497} sia rispetto al WT che al controllo (Figura 14).

Quindi l'isoforma BPIFB4-RV ha una ridotta capacità di attivare eNOS e PKC α , che si concretizzano in un deficit dilatatorio dei vasi.

Così come i vasi trasfettati con il costrutto codificante per BPIFB4-LAV, anche quelli che esprimono BPIFB4-RV non sono in grado di contrarsi efficacemente in risposta al K ed alla fenilefrina. Il fatto che entrambi non mostrino alterazioni nella risposta a U46619, che non implica un forte incremento di Ca²⁺, lascia presupporre che le due isoforme possano agire sulla mobilitazione del calcio.

CONCLUSIONI

Gli studi rivolti ad una maggiore comprensione dei fattori coinvolti nel processo di invecchiamento così come nella longevità sono aumentati in maniera esponenziale negli ultimi anni. La ragione è da ricercarsi sicuramente nell'aumento delle aspettative di vita e nell'incremento nel numero di persone anziane che a sua volta si traduce anche in una maggiore incidenza delle patologie associate alla vecchiaia. Dagli studi effettuati fino ad oggi è stato possibile associare con sicurezza al fenotipo longevo alcuni loci genici, come APOE ϵ 4, MTP e FOXO3A.

Studi *genome-wide* hanno evidenziato che la mutazione rs2070325 (Ile229Val) nel gene BPIFB4 è arricchita nei soggetti longevi. L'aplotipo di cui fa parte è costituito da quattro SNPs, la cui combinazione può portare alla formazione di una proteina BPIFB4-WT, di una isoforma associata alla longevità BPIFB4-LAV e di una variante rara BPIFB4-RV.

L'età è un fattore di rischio per lo sviluppo di malattie cardio-vascolari in quanto è associato ad un'alterazione delle funzioni endoteliali, e di conseguenza anche della vasodilatazione e della vasocostrizione. Ciò è causato principalmente da una progressiva riduzione della biodisponibilità di ossido nitrico, uno dei principali modulatori del sistema vascolare, la cui produzione da parte dell'ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS) è preservata nei centenari.

In questo lavoro è stato dimostrato che la proteina BPIFB4 è presente nelle pareti di arterie mesenteriche di topo e che i suoi livelli di espressione aumentano in seguito ad uno stress biomeccanico. La presenza di BPIFB4 è quindi indispensabile per la modulazione del tono vascolare. La sua inibizione tramite siRNA rende il vaso incapace di rispondere correttamente agli stimoli vasocompressori e vasodilatatori.

La variante di BPIFB4 associata alla longevità, BPIFB4-LAV, quando overespressa *ex vivo* in arterie mesenteriche di topo è in grado di

aumentare la capacità vasodilatatoria indotta da acetilcolina. Essa inoltre accentua la riduzione della vasodilatazione da parte dell'inibitore di eNOS, L-NAME. BPIFB4-LAV infatti, aumenta la concentrazione di ossido nitrico nella cellula endoteliale, potenziando la fosforilazione di eNOS sulla S1177 e la sua conseguente attivazione. Quest'ultima è strettamente correlata e dipende da un aumento della fosforilazione di PKC α sulla T497 che così viene attivata. Le arterie trasfettate con BPIFB4-LAV e trattate con Gö6976, un inibitore di PKC α , perdono la capacità di incrementare la dilatazione del vaso e mostrano una forte riduzione di eNOS fosforilato.

Inoltre, BPIFB4-LAV è in grado di ripristinare una normale capacità vasodilatatoria in arterie mesenteriche di topo knockout in eterozigosi per l'enzima Metilentetraidrofolato reduttasi. In questi vasi è stato possibile osservare anche uno switch-on di eNOS fosforilato senza che vi sia però nessuna modulazione di SIRT1.

I vasi trasfettati con il costrutto codificante per BPIFB4-RV invece, manifestano un'alterazione delle funzioni endoteliali simile a quella che si ottiene inibendo la produzione di BPIFB4 con il siRNA, associata ad una ridotta capacità di attivare eNOS e PKC α . Mentre BPIFB4-LAV determina solo una parziale riduzione della capacità del vaso di contrarsi in risposta al trattamento con fenilefrina e potassio, BPIFB4-RV è invece in grado di abolirla quasi completamente. Entrambe le varianti non alterano invece la risposta vascolare al composto U46619 suggerendo un possibile effetto sulla modulazione del rilascio del Ca⁺.

E' proprio questo aspetto potrebbe essere ulteriormente approfondito, così come sono ancora da chiarire i meccanismi molecolari che portano all'attivazione eNOS.

In conclusione questi dati hanno dimostrato la capacità della variante di BPIFB4 associata alla longevità, BPIFB4-LAV di indurre un miglioramento della reattività vascolare contrapponendosi alle variazioni dell'età; agendo sull'attivazione di PKC α e di eNOS.

Queste scoperte possono essere utilizzate per trattare terapeutamente le disfunzioni a carico di eNOS che si presentano durante il processo di invecchiamento, dimostrando in ultimo come l'individuo longevo possa rappresentare un buon modello per studiare le patologie correlate all'avanzare dell'età.

BIBLIOGRAFIA

1. Adapala RK, Talasila PK, Bratz IN, Zhang DX, Suzuki M, Meszaros JG, Thodeti CK, "PKC α mediates acetylcholine-induced activation of TRPV4-dependent calcium influx in endothelial cells", *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, Vol. 301, 2011, pp. H757-765.
2. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG, "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition", *Biochem J*, Vol. 357, 2001, pp. 593–615.
3. Amanchy R, Periaswamy B, Mathivanan S, Reddy R, Tattikota SG, Pandey A, "A curated compendium of phosphorylation motifs", *Nat Biotechnol*, Vol. 25, 2007, pp. 285-286.
4. Andrault JB, Gaillard I, Giorgi D, Rouquier S, "Expansion of the BPI family by duplication on human chromosome 20: characterization of the RY gene cluster in 20q11.21 encoding olfactory transporters/antimicrobial-like peptides", *Genomics*, Vol. 82, 2003, pp. 172-184.
5. Anselmi CV, Malovini A, Roncarati R, Novelli V, Villa F, Condorelli G, Bellazzi R, Puca AA, Association of the FOXO3A locus with extreme longevity in a southern Italian centenarian study", *Rejuvenation Res*, Vol. 12, 2009, pp. 95-104.
6. Barzilai N, Atzmon G, Schechter C, Schaefer EJ, Cupples AL, et al, "Unique lipoprotein phenotype and genotype associated with exceptional longevity", *JAMA*, Vol. 290, 2003, pp. 2030-40.
7. Barzilai N, Atzmon G, Derby CA, Bauman JM, Lipton RB, "A genotype of exceptional longevity is associated with preservation of cognitive function", *Neurology*, Vol. 67, 2006, pp. 2170-5.
8. Batchelor TJ, Sadaba JR, Ishola A, Pacaud P, Munsch CM, Beech DJ. "Rho-kinase inhibitors prevent agonist-induced vasospasm in human internal mammary artery", *Br J Pharmacol*, Vol. 132, 2001, pp. 302-308.
9. Bauer PM, Fulton D, Boo YC, Sorescu GP, Kemp BE, Jo H, et al. "Compensatory phosphorylation and protein–protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in endothelial nitric oxide synthase", *J Biol Chem*, Vol 278, 2003, pp. 14841–9.

10. Beamer LJ, Carroll SF, Eisenberg D, "Crystal structure of human bpi and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution", *Science*, Vol. 276, 1997, pp. 1861-1864
11. Bingle CD, Seal RL, Craven CJ, "Systematic nomenclature for the plunc/psp/bsp30/smgb proteins as a subfamily of the bpi fold-containing superfamily", *Biochem Soc Trans*, Vol. 39, 2011, pp. 977-983
12. Bingle CD, Craven CJ, "PLUNC: a novel family of candidate host defence proteins expressed in the upper airways and nasopharynx", *Hum Mol Genet*, Vol. 11, 2002, pp. 937-943.
13. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME, "Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase", *Science*, Vol. 303, 2004, pp. 2011-5.
14. Partovian C, Zhuang Z, Moodie K, Lin M, Ouchi N, Sessa WC, Walsh K, Simons M, "PKC ϵ Activates eNOS and Increases Arterial Blood Flow In Vivo", *Circ Res*, Vol.97, 2005, pp. 482-487.
15. Christensen K, McGue M, Petersen I, Jeune B, Vaupel JW, "Exceptional longevity does not result in excessive levels of disability", *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 105, 2008, pp. 13274-9.
16. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA, "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families", *Science*, Vol. 261, 1993, pp. 921-3.
17. Crane BR, Arvai AS, Ghosh DK, Wu C, Getzoff ED, Stuehr DJ, Tainer JA, "Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate", *Science*, Vol. 279, 1998, pp. 2121-2126.
18. Darviri C, Demakakos P, Charizani F, Tigani X, Tsiou C, Chalamandaris AG, Tsagkari C, Chliaoutakis J, "Assessment of the health status of Greek centenarians", *Arch Gerontol Geriatr*, Vol. 46, 2008, pp. 67-78.
19. Delp MD, Behnke BJ, Spier SA, Wu G, Muller-Delp JM, "Ageing diminishes endothelium-dependent vasodilatation and tetrahydrobiopterin content in rat skeletal muscle arterioles", *J. Physiol*, Vol. 586, 2007, pp. 1161-1168.
20. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM, "Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells byAkt-dependent phosphorylation", *Nature*, Vol. 399, 1999, pp. 601-5.

21. Donato AJ, Eskurza I, Silver AE, Levy AS, Pierce GL, Gates PE, Seals DR, "Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB", *Circ Res*, Vol. 100, 2007, pp. 1659–1666.
22. Donato AJ, Gano LB, Eskurza I, Silver AE, Gates PE, Jablonski K, Seals DR, "Vascular endothelial dysfunction with aging: endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase", *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, Vol. 297, 2009, pp. H425–432.
23. Dudzinski DM, Igarashi J, Greif DM, Michel T, "The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase", *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, Vol. 46, 2006, pp. 235–76.
24. Erwin PA, Lin AJ, Golan DE, Michel T, "Receptor-regulated dynamic S-nitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells", *J Biol Chem*, Vol. 280, 2005, pp. 19888–94.
25. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R, "Phosphorylation of Thr495 regulates Ca²⁺/calmodulin dependent endothelial nitric oxide synthase activity", *Circ Res*, Vol. 88, 2001, pp. E68–75.
26. Förstermann U and Sessa WC, "Nitric oxide synthases: regulation and function", *Eur Heart J*, Vol. 33, 2012, pp. 829-837.
27. Förstermann U, "Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease", *European journal of physiology*, Vol. 459, 2010, pp. 923–939.
28. Friedman DB, Johnson TE, "A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility", *Genetics*, Vol. 118, 1988, pp. 75-86.
29. Fulton D, Gratton J-P, Sessa WC, "Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough?", *J Pharmacol Exp Ther*, Vol. 299, 2001, pp. 818–24.
30. Geesaman BJ, Benson E, Brewster SJ, Kunkel LM, Blanché H, Thomas G, Perls TT, Daly MJ, Puca AA, "Haplotype-based identification of a microsomal transfer protein marker associated with the human lifespan", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100, 14115-14120 (2003).
31. Gonzalez E, Kou R, Lin AJ, Golan DE, Michel T, "Subcellular targeting and agonist-induced site-specific phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase", *J Biol Chem*, Vol. 277, 2002, pp. 39554–60.
32. Govers R, Rabelink TJ, "Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase", *Am J Physiol Renal Physiol*, Vol. 280, 2001, pp. F193–206.

33. Greer EL, Brunet A, "Signaling networks in aging", *J Cell Sci*, Vol. 121, 2008, pp. 407-12.
34. Greif DM, Sacks DB, Michel T, "Calmodulin phosphorylation and modulation of endothelial nitric oxide synthase catalysis", *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 101, 2004, pp. 1165–70.
35. Guevara-Aguirre J, Balasubramanian P, Guevara-Aguirre M, Wei M, Madia F, Cheng CW, Hwang D, Martin-Montalvo A, Saavedra J, Ingles S, et al, "Growth hormone receptor deficiency is associated with a major reduction in pro-aging signaling, cancer, and diabetes in humans", *Sci Transl Med*, Vol. 3, 2011, pp. 70.
36. Harris MB, Ju H, Venema VJ, Blackstone M, Venema RC, "Role of heat shock protein 90 in bradykinin-stimulated endothelial nitric oxide release", *Gen Pharmacol*, Vol. 35, 2000, pp. 165–70.
37. Hemmens B, Goessler W, Schmidt K, Mayer B. Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.*2000;275:35786–35791.
38. Herrera MD, Mingorance C, Rodriguez-Rodriguez R, Alvarez de Sotomayor M, "Endothelial dysfunction and aging: an update", *Ageing Res. Rev*, Vol. 9, 2010, pp. 142–152.
39. Herskind AM, McGue M, Holm NV, Sørensen TI, Harvald B, Vaupel JW, "The heritability of human longevity: a population-based study of 2872 Danish twin pairs born 1870-1900", *Hum Genet*, Vol. 97, 1996, pp. 319-23.
40. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Kimura M, Noma K, Hara K, Jitsuiki D, Goto C, Oshima T, Chayama K, Yoshizumi M, "Tetrahydrobiopterin improves aging-related impairment of endothelium-dependent vasodilation through increase in nitric oxide production", *Atherosclerosis*, Vol. 186, 2006, pp.390–395.
41. Hitt R, Young-Xu Y, Silver M, Perls T, "Centenarians: the older you get, the healthier you have been", *Lancet*, Vol. 354, 1999, pp. 652.
42. Huang PL, "eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease", *Trends Endocrinol Metab*, Vol. 20, 2009, pp.295–302.
43. Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE, "Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors", *Genes Dev*, Vol. 14, 2000, pp. 142-6.
44. Kleiger G, Beamer LJ, Grothe R, Mallick P, Eisenberg D, "A crystal structure of BPI: a study of how two dissimilar amino acid sequences can adopt the same fold", *J Mol Biol*, Vol. 299, 2000, pp. 1019-1034.

45. Kou R, Greif D, Michel T, "Dephosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase by vascular endothelial growth factor. Implications for the vascular responses to cyclosporin A", *J Biol Chem*, Vol. 277, 2002, pp. 29669–73.
46. Tafaro L, Cicconetti P, Baratta A, Brukner N, Ettorre E, Marigliano V, Cacciafesta M, "Sleep quality of centenarians: Cognitive and survival implications", *Archives of gerontology and geriatrics*, Vol. 44, 2007, pp. 385-389.
47. Lakatta EG, Levy D, "Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease", *Circulation*, Vol. 107, Vol. 2003, pp. 139–146.
48. Lee HW, Smith L, Pettit GR, Vinitzky A, Smith JB, "Ubiquitination of protein kinase c-alpha and degradation by the proteasome", *J Biol Chem*, Vol. 271, 1996, pp. 20973-20976.
49. Lemarie, C. A. *et al.* Mthfr deficiency induces endothelial progenitor cell senescence via uncoupling of eNOS and downregulation of SIRT1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 300, H745-753 (2011).
50. Lin SJ, Defossez PA, Guarente L, "Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*", *Science*, Vol. 289, 2000, pp. 2126-8.
51. Loscalzo J, Welch G, "Nitric oxide and its role in the cardiovascular system", *Prog Cardiovasc Dis*, Vol. 38, 1995, pp.87–104.
52. Martínez-Ruiz A, Villanueva L, González de Orduña C, López-Ferrer D, Ángeles Higeuras M, Tarín C, *et al.*, "S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities", *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 102, 2005, pp. 8525–30.
53. Mattagajasingh I, Kim CS, Naqvi A, Yamamori T, Hoffman TA, Jung SB, De Ricco J, Kasuno K, Irani K. "Sirt-1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase", *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 104, 2007, pp. 14855-14860.
54. Maurya PK, Rizvi SI, "Alterations in plasma nitric oxide during aging in humans", *Indian J Biochem Biophys*, Vol. 46, 2009, pp. 130–132.
55. McCabe TJ, Fulton D, Roman LJ, Sessa W, "Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation", *J Biol Chem*, Vol. 275, 2000, pp. 6123–8.

56. McElwee J, Bubbs K, Thomas JH, "Transcriptional outputs of the *Caenorhabditis elegans* forkhead protein DAF-16", *Aging Cell*, Vol. 2, 2003, pp. 111-21.
57. Michell BJ, Harris MB, Chen ZP, Ju H, Venema VJ, Blackstone MA, et al., "Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635", *J Biol Chem*, Vol.277, 2002, pp. 42344–51.
58. Moncada S, Higgs EA, "The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology", *Br. J. Pharmacol*, Vol. 147(Suppl. 1), 2006, pp. S193–S201.
59. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA, "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology", *Pharmacol Rev*, Vol. 43, 1991, pp. 109-42.
60. Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ, "Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser1179", *J Biol Chem*, Vol. 276, 2001, pp. 30392–8.
61. Murphy CT, McCarroll SA, Bargmann CI, Fraser A, Kamath RS, Ahringer J, Li H, Kenyon C, "Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*", *Nature*, Vol. 424, 2003, pp. 277-83.
62. Nebel A, Kleindorff R, Caliebe A, Nothnagel M, Blanche H, Junge O, Wittig M, Ellinghaus D, Flachsbarth F, Wichmann HE, Meitinger T, Nikolaus S, Franke A, et al., "A genome-wide association study confirms APOE as the major gene influencing survival in long-lived individuals", *Mech Ageing Dev*, Vol. 132, 2011, pp. 324-330.
63. Nebel A, Croucher PJ, Stiegeler R, Nikolaus S, Krawczak M, Schreiber S, "No association between microsomal triglyceride transfer protein (MTP) haplotype and longevity in humans", *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 102, 2005, pp. 7906-9.
64. Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO, "Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS", *Science*, Vol. 310, 2005, pp. 314–317.
65. Ota H, Akishita M, Eto M, Iijima K, Kaneki M, Ouchi Y, "Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells", *J Mol Cell Cardiol*, Vol. 43, 2007, pp.571–579.

66. Ota H, Eto M, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y, "SIRT1/eNOS axis as a potential target against vascular senescence, dysfunction and atherosclerosis", *J Atheroscler Thromb*, Vol. 17, 2010, pp. 431–435.
67. OtaH, Akishita M, Eto M, Iijima K, Kaneki M, Ouchi Y, "Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells", *J Mol Cell Cardiol* Vol. 43, 2007, pp. 571-579.
68. Ozaki A, Uchiyama M, Tagaya H, Ohida T, Ogihara R, "The Japanese Centenarian Study: autonomy was associated with health practices as well as physical status", *J Am Geriatr Soc*, Vol. 55, 2007, pp. 95-101.
69. Perls T, Terry D, "Understanding the determinants of exceptional longevity", *Ann Intern Med*, Vol. 139, 20003, pp. 445-9.
70. Perls TT, Wilmoth J, Levenson R, Drinkwater M, Cohen M, Bogan H, Joyce E, Brewster S, Kunkel L, Puca A, "Life-long sustained mortality advantage of siblings of centenarians", *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 99, 2002, pp. 8442-7.
71. Perls TT, Bochen K, Freeman M, Alpert L, Silver MH, "Validity of reported age and centenarian prevalence in New England", *Age Ageing*. Vol. 28, 1999, pp. 193-7.
72. Prabhakar P, Cheng V, Michel T, "A chimeric transmembrane domain directs endothelial nitric-oxide synthase palmitoylation and targeting to plasmalemmal caveolae", *J Biol Chem*, Vol. 275, 2000, pp.19416–21.
73. Qiu X, Mistry A, Ammirati MJ, Chrnyk BA, Clark RW, Cong Y, Culp JS, Danley DE, Freeman TB, Geoghegan KF, et al., "Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules", *Nat Struct Mol Biol*, Vol. 14, 2007, pp. 106-113.
74. Raju SV, Barouch LA, Hare JM, "Nitric oxide and oxidative stress in cardiovascular aging", *Sci Aging Knowledge Environ: SAGE KE* 2005.
75. Raman CS, Li H, Martasek P, Kral V, Masters BS, Poulos TL. Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell*. 1998;95:939–950.
76. Rebeck GW, Perls TT, West HL, Sodhi P, Lipsitz LA, Hyman BT, "Reduced apolipoprotein epsilon 4 allele frequency in the oldest old Alzheimer's patients and cognitively normal individuals", *Neurology*, Vol. 44, 1994, pp.1513-6.
77. Rippe C, Lesniewski L, Connell M, LaRocca T, Donato A, Seals D, "Short-term calorie restriction reverses vascular endothelial dysfunction in old mice by increasing nitric oxide and reducing oxidative stress", *Aging Cell*, Vol. 9, 2010, pp.304–312.

78. Rodriguez-Manas L, El-Assar M, Vallejo S, Lopez-Doriga P, Solis J, Petidier R, Montes M, Nevado J, Castro M, Gomez-Guerrero C, et al., "Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation", *Aging Cell*, Vol. 8, 2009, pp.226–238.
79. Rodriguez-Manas L, El-Assar M, Vallejo S, Lopez-Doriga P, Solis J, Petidier R, Montes M, Nevado J, Castro M, Gomez-Guerrero C, Peiro C, Sanchez-Ferrer CF, "Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation", *Aging Cell*, Vol. 8, 2008, pp. 226–238.
80. Schächter F, Faure-Delanef L, Guénot F, Rouger H, Froguel P, Lesueur-Ginot L, Cohen D, "Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci", *Nat Genet*, Vol. 6, 1994, pp. 29-32.
81. Seals DR, Jablonski KL, Donato AJ, "Aging and vascular endothelial function in humans", *Clin. Sci*, Vol. 20, 2011, pp. 357–375.
82. Sekiguchi F, Nakahira T, Kawata K, Sunano S, "Responses to endotheliumderived factors and their interaction in mesenteric arteries from Wistar-Kyoto and stroke-prone spontaneously hypertensive rats", *Clin Exp Pharmacol Physiol*, Vol. 29, 2002, pp. 1066-1074.
83. Shaul PW, Anderson RG, "Role of plasmalemmal caveolae in signal Transduction", *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, Vol. 275, 1998, pp. L843–51.
84. Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, et al., "Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae", *J Biol Chem*, Vol.271, 1996, pp. 6518–22.
85. Shaul PW, "Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location", *Annu Rev Physiol*, Vol. 64, 2002, pp. 749–74.
86. Singh PP, Singh M, Mastana SS, "APOE distribution in world populations with new data from India and the UK", *Ann Hum Biol*, Vol. 33, 2006, pp. 279-308.
87. Sobel E, Louhija J, Sulkava R, Davanipour Z, Kontula K, Miettinen H, Tikkanen M, Kainulainen K, Tilvis R, "Lack of association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset Alzheimer's disease among Finnish centenarians", *Neurology*, Vol. 45, 1995, pp. 903-7.
88. Terry DF, Wilcox MA, McCormick MA, Pennington JY, Schoenhofen EA, Andersen SL, Perls TT, "Lower all-cause, cardiovascular, and cancer mortality in centenarians' offspring", *J Am Geriatr Soc*, Vol. 52, 2004, pp. 2074-6.

89. Terry DF, Sebastiani P, Andersen SL, Perls TT, "Disentangling the roles of disability and morbidity in survival to exceptional old age", *Arch Intern Med*, Vol. 168, 2008, pp. 277-83.
90. Toda N, "Age-related changes in endothelial function and blood flow regulation", *Pharmacol. Ther*, Vol. 133, 2011, pp. 159–176.
91. Tsikas D, Haufe S, Stichtenoth DO, Jordan J, "Nitric oxide and hypertension", *J Hypertens*, Vol. 30, 2012, pp. 625–626.
92. Tsutsui M, Shimokawa H, Otsuji Y, Ueta Y, Sasaguri Y, Yanagihara N, "Nitric oxide synthases and cardiovascular diseases: insights from genetically modified mice", *Circ. J*, Vol. 73, 2009, pp. 986–993.
93. Vaupel JW, Carey JR, Christensen K, Johnson TE, Yashin AI, Holm NV, Iachine IA, Kannisto V, Khazaeli AA, Liedo P, Longo VD, Zeng Y, Manton KG, Curtsinger JW, "Biodemographic trajectories of longevity", *Science*, Vol. 280, 1998, pp. 855-60.
94. Vecchione C, Patrucco E, Marino G et al., "Protection from angiotensin II-mediated vasculotoxic and hypertensive response in mice lacking PI3Kgamma", *J Exp Med*, Vol. 201, 2005, pp.1217-1228.
95. Wei Q, Xia Y, "Roles of 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 in the regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and function by heat shock protein 90", *J Biol Chem*, Vol. 208, 2005; pp. 18081–6.
96. Zhang DX, Mendoza SA, Bubolz AH, Mizuno A, Ge ZD, Li R, Wartier DC, Suzuki M, Gutterman DD, "Transient receptor potential vanilloid type 4-deficient mice exhibit impaired endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine in vitro and in vivo", *Hypertension*, Vol. 53, 2009, pp. 532–538.

RINGRAZIAMENTI

Prima di tutto desidero ringraziare la Scuola di Dottorato che mi ha fornito gli strumenti necessari per portare a termine il mio percorso di studio e mi ha permesso di approfondire numerose tematiche scientifiche utili a sviluppare il mio progetto di tesi.

Ringrazio il gentilissimo Prof. Silvano Bosari per la sua disponibilità, gentilezza e competenza.

Ringrazio sinceramente e di cuore il Dott. Annibale Puca che mi ha dato fiducia permettendomi di portare a termine il mio percorso di studio. Mi ha ricordato perché ho scelto di dedicarmi alla ricerca ed è grazie a Lui se credo ancora in quello che faccio.

Ringrazio Tutti i miei compagni di laboratorio. Marina, Giuseppe, Sara, Serena e Marilù mi hanno insegnato cosa vuol dire lavorare con passione, sono stati sempre pronti ad offrirmi il loro supporto scientifico e morale e hanno condiviso con me sia i momenti felici e di soddisfazione che quelli stressanti e deludenti. Anna, Francesco ed Anna mi hanno accolto a braccia aperte facendomi sentire sin da subito parte del gruppo, sostenendomi ed aiutandomi nell'ultima, ma importante parte del mio percorso.

Un ringraziamento tutto speciale va a chi seppur lontano, non mi ha mai fatto mancare affetto e sostegno. Grazie a Giorgio, Silvia e al piccolo Alberto che mi hanno sempre incoraggiata e sono riusciti a strapparmi sempre e comunque un sorriso.

Alla mia Mamma e al mio Papà dedico questo traguardo...se sono arrivata fin qui è perché non hanno mai smesso di credere in me, se ho fatto qualcosa di buono è grazie ai loro insegnamenti.

Infine...ringrazio con tutto il cuore mio marito Andrea per avermi supportata ma soprattutto sopportata nei momenti più bui, senza avermi mai fatto mancare il suo amore.